

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

PAULA LOPES RODRIGUES

EFEITOS BENÉFICOS DO ÁCIDO LINOLEICO SOBRE A
DISFUNÇÃO CONTRÁTIL E BIOENERGÉTICA
MITOCONDRIAL APÓS INFARTO AGUDO DO
MIOCÁRDIO

Vitória - ES

2017

PAULA LOPES RODRIGUES

**EFEITOS BENÉFICOS DO ÁCIDO LINOLEICO SOBRE A
DISFUNÇÃO CONTRÁTIL E BIOENERGÉTICA
MITOCONDRIAL APÓS INFARTO AGUDO DO
MIOCÁRDIO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Faustino Ribeiro Junior

Vitória – ES

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca etorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)
Bibliotecário: Rafael Lima de Carvalho – CRB-6 MG-002926/O

R696e Rodrigues, Paula Lopes, 1981-
Efeitos benéficos do ácido linoleico sobre a disfunção contrátil e
bioenergética mitocondrial após infarto agudo do miocárdio / Paula Lopes
Rodrigues – 2017.
146 f. : il.

Orientador: Rogério Faustino Ribeiro Junior.
Coorientador: Ivanita Stefanon.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal do
Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Infarto do Miocárdio. 2. Mitocôndrias Cardíacas. 3. Ácido Linoleico.
4. Metabolismo Energético. 5. Acoplamento Excitação-Contração. I. Ribeiro
Junior, Rogério Faustino. II. Stefanon, Ivanita. III. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas


REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE TESE DA CANDIDATA AO
TÍTULO DE DOUTORA PELO PPGCF/CCS/UFES

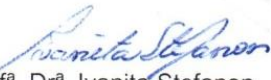
Nº Matrícula do^(a) Candidato^(a): 2012240602

A Comissão Julgadora que examinou a Tese de Doutorado, intitulada **"Efeitos benéficos do ácido linoleico sobre a disfunção contrátil e bioenergética mitocondrial nas subpopulações intermiofibrilar e subsarcolemal em ratos após infarto agudo do miocárdio"**, apresentada e defendida publicamente pela aluna **Paula Lopes Rodrigues**, no dia 07 de novembro de 2017, às 13h00, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida tese de Doutorado e, portanto, declara que a aluna faz jus à obtenção do Título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Vitória – ES, 07 de novembro de 2017.


Prof. Dr. Rogério Faustino Ribeiro Júnior
(Orientador)


Profª Drª Silvia Carolina Guatimosim Fonseca
(Membro Externo)


Profª Drª Ivanita Stefanon
(Co-orientadora)


Prof. Dr. André Soares Leopoldo
(Membro Externo)


Profª Drª Suely Gomes de Figueiredo
(Membro Interno)


Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo
(Membro Interno)

Observação: Documento de tramitação interna da Ufes. Não é comprobatório de conclusão de curso.
Av. Marechal Campos 1468, Vitória - ES 29043-900 - Brasil.
Tel.: 0XX(27) 3335-7340 Fax: 3335-7330

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por sempre guiar meus passos e me dar forças nos momentos em que a caminhada parecia árdua demais, me permitindo chegar até aqui.

Aos meus pais, Carlos César e Olga Júlia, por serem minha base, meu porto seguro e por não medirem esforços para me ajudar na rotina diária de mãe e pós graduanda. A minha irmã por todo amor, amizade e apoio. Ao meu cunhado Alexandre, por todo carinho e incentivo.

Ao meu marido Victor, a quem me faltam palavras... Obrigada por tudo. Por assumir a casa, por respeitar meus silêncios, por entender meus desesperos, pelas palavras de incentivo, pela amizade, pelo amor e pelo companheirismo.

Aos meus amados filhos, Yuri e Pietra. Um dia vocês entenderão minhas ausências... Chegar em casa e poder brincar com vocês, mesmo depois de um dia inteiro fazendo mitocôndria ou *western blot*, era o que precisava para repor minhas energias.

A Cláudia, o anjo que Deus colocou em minha vida. Obrigada por cuidar dos meus filhos com tanto amor e dedicação. Obrigada por cuidar de mim quando o cansaço parecia ser mais forte que eu. A Márcia, pelo carinho!

A professora Dra. Ivanita, pela oportunidade da realização do doutorado. Obrigada por toda orientação e dedicação para realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Rogério, por dividir comigo todo seu conhecimento técnico científico e nunca medir esforços para que o melhor deste trabalho fosse alcançado.

Ao nosso chefe Prof. Dr. Dalton por permitir ao LEMC ser o que é, ao Prof. Dr. Leo pelas idéias agregadoras e a minha querida amiga Profa. Dra. Alessandra, pelo ombro amigo e palavras de incentivo.

As Gatas da Mitocôndria, pelo companheirismo fundamental durante todo este trabalho. Karol obrigada por cuidar dos nossos animais, Patrícia obrigada por nos mostrar que sempre podemos mais e Elis, obrigada por ser meu equilíbrio, pelo silêncio que acalma, pelas palavras lindas de cada dia, pela amizade para vida.

As amizades que ultrapassaram o laboratório e que agora ultrapassam nossa geração: Teca (quem me apresentou ao LEMC), Lorena, Miriam, Fabiana Simões, Fabiana Siman, Aurélia, Jhuli Keli, Jonaína, Edna, Priscila Rossi. Agora também sou doutora! Obrigada meninas por serem tão especial em minha vida!

Aos colegas do LEMC que tornaram esses anos mais leves: Camila, Gilson, Renatinha, Emily, Marito, Dieli, Sabrina, Kleydiane, Tati, Cindy, Karol, Vinícius, Bruna, Felipe Strela, Felipe Filetti, Rebeca.

Aos colegas da pós graduação, especialmente Antônio e Edgar. Vocês fizeram a diferença num momento difícil!

A Ludimila, Enildo, Gustavo, Luciene, Maylla, Jairo e professor Breno pela ajuda em determinadas etapas do trabalho.

Aos parentes e amigos, obrigada por tantas vezes compreenderem minha distância.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPES (Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo) pelo apoio financeiro.

“Que uma fé viva os dirija, que uma esperança firme em Deus os sustente, que um amor sem limites os inflame num santo zelo pela santidade pessoal e pelo sucesso na missão em que se encontra... Que a humildade embeleze atitudes e vida.”

(Pe. Gaillac)

RESUMO

Após um evento isquêmico agudo, a perda de miocárdio determina aparecimento de disfunção mecânica do coração. A falência cardíaca ocorre por um prejuízo no metabolismo energético e está associada a menor produção de trifosfato de adenosina e o aumento exacerbado do estresse oxidativo oriundos da disfunção mitocondrial acompanhada de perdas na cadeia acil-linoleico da cardiolipina. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do ácido linoleico (AL) sobre a mecânica cardíaca e as disfunções nas duas subpopulações mitocondriais cardíacas distintas especialmente, as mitocôndrias subsarcolemas (SSM) e interfibrilares (IFM) de ratos com infarto do miocárdio (IM). Ratos Wistar foram divididos em grupos e receberam 0,1 mL i.m. diferentes doses de AL (5 mg/Kg, 15 mg/Kg e 50 mg/Kg) e NaCl por 15 dias. Não foram encontradas diferenças nas pressões arteriais diastólica (PAD) e sistólica (PAS) entre os grupos Sham e tratados com AL (PAS: Sham 102 ± 2 ; AL5: 92 ± 3 ; AL15: 102 ± 3 ; AL50: 104 ± 4 mmHg; PAD: Sham 64 ± 2 ; AL5: 57 ± 3 ; AL15: 66 ± 3 ; AL50: 71 ± 6 mmHg). A elevação da pressão diastólica do ventrículo esquerdo (PD) promoveu maior aumento da pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE) nos grupos tratados (PD 15 mmHg: Sham $85,9 \pm 4,8$; AL15: $107,1 \pm 7$; AL50: $135,8 \pm 13,2^*$ mmHg; $*p < 0,05$). A resposta inotrópica ao aumento do Ca^{2+} 2,5 mM foi maior no grupo AL50 (Sham $93,9 \pm 5,3$; AL50: $116,6 \pm 5^*$ mmHg; $*p < 0,05$). A função mitocondrial, usando o substrato Glutamato + Malato (G + M), estava aumentada no estado 3 da fosforilação oxidativa em todos os grupos tratados com AL (Sham $124 \pm 16,6$; AL5: $193 \pm 17^*$; AL15: $138 \pm 19^*$; AL50: $162 \pm 14^*$ nmol O/min/mg proteína; $*p < 0,05$). O tratamento com AL diminuiu a probabilidade de abertura do poro mitocondrial induzida por cálcio (Sham 49754 ± 1185 ; AL5: $45369 \pm 1090^*$; AL15: $46563 \pm 1026^*$; AL50: $39851 \pm 5677^*$ nmol Ca^{2+} /mg proteína; $*p < 0,05$). O teste de tolerância ao cálcio, estava maior no grupo AL50 (Sham $0,895 \pm 0,009$; AL50: $0,914 \pm 0,006^*$; $*p < 0,05$ após 640 s). A dose de AL50 foi então selecionada para o tratamento, durante 15 dias, dos animais que sofreram infarto do miocárdio por meio da oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda (IM) e dos animais controles submetidos a cirurgia fictícia (Sham). Os animais foram divididos para receber, por 15 dias

0,1 mL i.m. de NaCl (Sham e IM) ou ácido linoleico 50 mg/Kg, grupo Sham (AL) e grupo IM (IMAL). Após esse período foram realizadas análises histológicas e avaliação da função ventricular e mitocondrial de ventrículo esquerdo além da expressão de proteínas. Os animais IM e IMAL, desenvolveram alterações fenotípicas semelhantes, como aumento da massa cardíaca e maior deposição de tecido fibroso cardíaco, e tamanho do infarto. No entanto, o AL foi capaz de impedir a disfunção ventricular após IM (PSIVE Sham: 110 ± 15 ; IM: $52 \pm 16^*$; IMAL: 88 ± 32 mmHg, * vs Sham; * $p < 0,05$). Além disso, o AL impediu a instalação do quadro de disfunção mitocondrial cardíaca do grupo IM representada pela redução na taxa de fosforilação oxidativa com os substratos G + M (Controle Respiratório (RCR) IFM Sham: $2,94 \pm 0,24$; IM: $1,81 \pm 0,17^*$; IMAL: $2,55 \pm 0,38$, * vs Sham; $p < 0,05$), piruvato + malato (RCR IFM Sham: $2,40 \pm 0,26$; IM: $1,97 \pm 0,2^*$; IMAL: $2,35 \pm 0,5$, * vs Sham; * $p < 0,05$), na subpopulação IFM e SSM; no aumento da expressão do fator nuclear respiratório (NRF-1) (Sham: $0,8 \pm 0,1$; IM: $1,2 \pm 0,2^*$; IMAL: $0,9 \pm 0,2$, * vs Sham; * $p < 0,05$) e da capacidade de retenção de cálcio (IFM Sham: 50924 ± 6037 ; IM: $24541 \pm 4459^*$; IMAL: $13064 \pm 13191^*$, *vs Sham; * $p < 0,05$). O grupo IM apresentou disfunção da cadeia transportadora de elétrons com diminuição dos complexos III, IV e V na subpopulação mitocondrial IFM e aumento dos complexos I, II, III e IV na SSM no grupo IMAL. Além de diminuição da expressão do Uniporter e aumento da ciclofilina no grupo IM apenas na subpopulação IFM. Em conclusão o tratamento com ácido linoleico, na dose de 50 mg/Kg durante 15 dias, minimiza a disfunção ventricular esquerda e melhora a função mitocondrial das subpopulações SSM e IFM em ratos que sofreram IM.

Palavras Chave: infarto do miocárdio; mitocôndria; ácido linoleico; metabolismo energético; acoplamento excitação-contração.

ABSTRACT

After an acute ischemic event, myocardial loss determines the appearance of mechanical dysfunction of the heart. Cardiac failure can be associated to a loss of energy metabolism due to a lower production of adenosine triphosphate and exacerbation of oxidative stress from cardiac mitochondrion accompanied by losses in the acyl linoleic chain of cardiolipin. The aim of the present study was to evaluate the effects of linoleic acid (LA) on cardiac contractility and mitochondrial function in two spatially distinct subpopulations: the subsarcolemmal mitochondria (SSM) and interfibrillar mitochondria (IFM) of rats followed myocardial infarction (MI). The first part of this study was designed to determine the LA dose able to improve cardiac and mitochondrial function in control rats. Wistar rats were divided into groups and received 0.1 mL i.m. from different doses of AL (5 mg / kg, 15 mg / kg and 50 mg / kg) or saline 0.9% for 15 days. No differences were found in the diastolic (DBP) and systolic (SBP) arterial pressures among the Sham and LA groups (SBP: Sham 102 ± 2 ; LA5: 92 ± 3 ; LA15: 102 ± 3 ; LA50: 104 ± 4 mmHg; DBP: Sham 64 ± 2 , LA5: 57 ± 3 , LA15: 66 ± 3 , LA50: 71 ± 6 mmHg). The increase of left ventricular diastolic pressure (DP) promoted a greater increment in left ventricular isovolumic pressure (LVISP) in the LA treated groups (DP 15 mmHg: Sham $85,9 \pm 4,8$, LA15: $107,1 \pm 7$, LA50 : $135,8 \pm 13,2$ * mmHg, * $p < 0,05$). The inotropic response to 2,5 mM Ca^{2+} was higher in the LA50 group (Sham $93,9 \pm 5,3$, LA50: $116,6 \pm 5$ * mmHg, * $p < 0,05$). Mitochondrial function, using the substrate Glutamate + Malate (G + M), was increased in state 3 of oxidative phosphorylation in all LA-treated groups (Sham $124 \pm 16,6$, LA5: 193 ± 17 *, LA15: 138 ± 19 *; LA50: 162 ± 14 * nmol O / min / mg protein; * $p < 0,05$). The treatment with LA decreased the probability of calcium-induced mitochondrial pore opening (Sham 49754 ± 1185 ; LA5: 45369 ± 1090 *; LA5: 46563 ± 1026 *; LA50: 39851 ± 5677 * nmol Ca^{2+} / mg protein; * $p < 0,05$). The calcium tolerance test was higher in the LA50 group (Sham: $0,895 \pm 0,009$; AL50: $0,914 \pm 0,006$ *; * $p < 0,05$ after 640 s). Considering those results, in the second part of this study, we selected the dose 50 mg / kg of LA to treat the MI rats during 15 days. MI was surgical induced by the occlusion of the left anterior descending coronary artery (MI) and the control animals submitted to sham surgery. The animals

were divided to receive, for 15 days 0.1 mL i.m. of NaCl (Sham and MI) or linoleic acid 50 mg / kg, Sham group (LA) and MI group (MILA). After this period, histological analyzes and evaluation of ventricular and left ventricular mitochondrial function were performed in addition to cardiac protein expression (SERCA-2a, PLB, PGC1 α , NRF e PPAR α). MI and MILA animals developed similar phenotypic changes, such as increased heart mass, increased deposition of cardiac fibrous tissue, and infarct size. However, LA partially prevented ventricular dysfunction after MI (LVISP Sham: 110 ± 15 ; MI: $52 \pm 16^*$; MILA: 88 ± 32 mmHg, * vs Sham; * p <0,05). In addition, LA prevented the cardiac mitochondrial dysfunction of the MI group represented by the reduction in the rate of oxidative phosphorylation with the substrates G + M (Respiratory Control Ratio (RCR) IFM Sham: $2,94 \pm 0,24$; MI: $1,81 \pm 0,17^*$; MILA: $2,55 \pm 0,38$,* vs Sham; p<0,05), piruvate + malate (RCR IFM Sham: $2,40 \pm 0,26$; MI: $1,97 \pm 0,2^*$; MILA: $2,35 \pm 0,5$,* vs Sham;*p<0,05) in the IFM and SSM subpopulation; (Sham: $0,8 \pm 0,1$, MI: $1,2 \pm 0,2^*$, MILA: $0,9 \pm 0,2$, * vs Sham; p<0,05) and calcium retention capacity (IFM Sham: 50924 ± 6037 ; MI: $24541 \pm 4459^*$; MILA: $13064 \pm 13191^*$, * vs Sham; * p <0,05). The MI group showed dysfunction of the electron transport chain with decreased complexes III, IV and V in the mitochondrial IFM subpopulation, increased the complexes I, II, III and IV in SSM in the MILA group. LA treatment decreased expression of Uniporter and increase of cyclophilin in the MI group only in the IFM subpopulation. In conclusion, treatment with linoleic acid at a dose of 50 mg / kg for 15 days partially prevent the left ventricular dysfunction and improve the mitochondrial function of the SSM and IFM subpopulations after MI in rats.

Keywords: myocardial infarction; mitochondria; linoleic acid; energy metabolism; excitation-contraction coupling.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Infarto do miocárdio	17
1.2 Mitocôndria.....	19
1.3 Função Mitocondrial	22
1.4 A Cardiolipina.....	25
1.5 O ion Ca^{2+} e sua relação com a mitocôndria – Canal Uniplex	26
1.6 Alterações da função mitocondrial durante a disfunção ventricular por infarto agudo do miocárdio.....	29
1.5.1 Seletividade dos substratos mitocondrial	30
1.5.2 Aumento na produção de EROs.....	31
1.5.3 Anormalidades na ETC mitocondrial	32
1.5.4 Alterações nos Poros Mitocondriais.....	33
1.6 Homeostase Mitocondrial e Mecânica Cardíaca	34
1.7 Interação entre a função mitocondrial e o retículo sarcoplasmático....	36
1.8 Ácidos graxos – ácido linoleico	37
2. OBJETIVO.....	44
2.1 Objetivos específicos	44
3. MATERIAL E MÉTODO	45
3.1 Animais experimentais	45
3.2 Indução do infarto do miocárdio	46
3.3 Hemodinâmica arterial e ventricular por medida direta em animal anestesiado.....	47
3.4 Avaliação do desempenho em corações isolados perfundidos pela técnica de Langendorff.....	48
3.4.1 Protocolos experimentais.....	49
3.5 Isolamento mitocondrial	50

3.5.1 Análise funcional da cadeia respiratória mitocondrial – oxidação fosforilativa.....	51
3.5.2 Medidas indireta do potencial de membrana e tamanho da mitocôndria	52
3.5.3 Captação do cálcio e probabilidade de abertura do poro mitocondrial	53
3.5.4 Resistência ao cálcio (<i>Swelling</i>)	53
3.6 Determinação da hipertrofia cardíaca e extensão do infarto	53
3.6.1 Análises histológicas.....	54
3.7 Estudo da expressão proteica pela técnica de western blot	57
3.8 Expressão dos resultados e análise estatística	59
3.9 Fármacos e reagentes utilizados	59
4. RESULTADOS	61
4.1 Análise de parâmetros ponderais após 15 dias de tratamento com diferentes doses de AL	61
4.2 Parâmetros hemodinâmicos	63
4.3 Avaliação dos parâmetros cardíacos em corações isolados.....	64
4.3.1 Intervenção Heterométrica.....	64
4.3.2 Intervenção Homeométrica: avaliação da resposta ao cálcio	66
4.3.3 Intervenção Homeométrica: resposta β -adrenérgica	67
4.4 Caracterização da função mitocondrial cardíaca de ratos tratados com ácido linoleico	67
4.4.1 <i>Yield</i> mitocondrial.....	67
4.4.2 Respiração mitocondrial	68
4.4.3 Análise da resistência ao cálcio – <i>Swelling</i>	71
4.4.4 Probabilidade de abertura do poro mitocondrial	74
4.5 Análise de parâmetros: ponderal, morfométrico e funcional de ratos infartados após 15 dias de tratamento com ácido linoleico.....	76

4.6 Efeito do ácido linoleico sobre a disfunção cardíaca em coração isolado	79
4.7 Efeitos do ácido linoleico e do infarto do miocárdio na expressão de proteínas envolvidas na sinalização do cálcio	80
4.7 Rendimento mitocondrial – <i>Yield</i>	83
4.4 Caracterização da função e da morfologia mitocondrial por citometria de fluxo	85
4.5 Caracterização da função mitocondrial cardíaca em modelo animal de disfunção cardíaca associado ao infarto do miocárdio: Efeito do ácido linoleico	87
4.5.1 Subpopulação Intermiofibrilar – IFM	87
4.5.2 Subpopulação Subsarcolemal – SSM.....	93
4.6 Atividade das enzimas envolvidas na dinâmica mitocondrial na disfunção cardíaca e no tratamento com ácido linoleico por 15 dias	99
5. DISCUSSÃO	101
5.1 Caracterização do modelo de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio: efeito do ácido linoleico	102
5.2 Caracterização da função mitocondrial cardíaca em modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio.....	105
5.3 Efeitos do ácido linoléico sobre a função mitocondrial cardíaca em modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio ..	112
6. CONCLUSÃO.....	116
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morte na população brasileira sendo responsáveis por pelo menos 20% das mortes de indivíduos com mais de 30 anos de idade (Mansur et al, 2012; Mansur et al, 2016). Dentre as doenças que afetam o sistema cardiovascular, a doença arterial coronariana, que tem no infarto do miocárdio o seu principal efector, é responsável por aproximadamente metade dos óbitos entre os americanos (American Heart Association, 2012). No Brasil, o infarto agudo do miocárdio é primeira causa de mortes registrando mais de 117 mil óbitos anuais devido à doença no ano de 2015 (DATASUS 2014, Brant et al, 2017), com um agravante de que a mortalidade devido à isquemia miocárdica tem ocorrido em idades progressivamente mais precoces (Luz, Santos & Sabino, 2017).

Apesar da Organização Mundial de Saúde estimar um aumento de 145% na taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares nos países em desenvolvimento no período de 1990 a 2020 (Rubinstein et al, 2010), dados do *Global Burden of Disease* 2015 mostram redução da mortalidade global por doença cardiovascular padronizada por idade no Brasil entre 1990 e 2015. Essa redução foi mais pronunciada nos estados das regiões Sul e Sudeste, e menos significativa no Norte e no Nordeste, podendo ter sido influenciada pelos índices de desenvolvimento econômico (Brant et al, 2017).

Após um evento isquêmico agudo, a perda de miocárdio determina aparecimento de disfunção mecânica do coração, que pode evoluir sem manifestações clínicas por longos períodos de tempo. Porém, mesmo que o paciente sobreviva a injúria do infarto agudo do miocárdio, as consequências dessa doença podem ser catastróficas, como o desenvolvimento progressivo de distúrbio cardíaco funcional e/ou estrutural, que caracteriza a síndrome de insuficiência cardíaca (Bauersachs & Widder, 2008; Bocchi et al, 2012). Com a síndrome e após aparecimento de sintomas cerca de 50% dos pacientes vão a óbito em 5 anos (Roger et al., 2004).

A evolução da isquemia do miocárdio tem enormes repercussões sobre o Sistema Único de saúde, sendo um dos itens de maior dispêndio que, frequentemente exige internação hospitalar. Os gastos com consultas e

internações pelo Sistema Único de Saúde (SUS) passaram dos 5 bilhões de reais em 2015 (Siqueira et al, 2017), enquanto nos EUA esse valor ultrapassa 30 bilhões de dólares anualmente (Brown et al, 2016). Além dos altos custos hospitalares, o infarto do miocárdio provoca sensível perda da qualidade de vida do paciente, resultando em aposentadorias precoces e consequentemente em altos custos socioeconômicos para o país (Bocchi et al., 2012).

Com a evolução das pesquisas científicas, a utilização de métodos mais eficientes no tratamento precoce após a injúria cardiovascular provocada pelo infarto agudo do miocárdio e o concomitante envelhecimento populacional resultaram no aumento da incidência da insuficiência cardíaca mundialmente. Roger et al (2004) observaram aumento progressivo na incidência de insuficiência cardíaca na população americana, Gomez-Soto et al. (2010) também observaram aumento da incidência de insuficiência cardíaca na população espanhola, apesar de redução da taxa de mortalidade, em vista de melhoras nos métodos de tratamento desta síndrome, e Gauri et al. (2010) reportaram redução na mortalidade por insuficiência cardíaca no Brasil.

Apesar dos grandes avanços no entendimento e no tratamento das injúrias cardiovasculares nos últimos anos, a mortalidade dos pacientes permanece elevada, pois o coração é incapaz de ejetar ou se encher de sangue em taxas suficientes para manter o débito cardíaco adequado às demandas metabólicas teciduais (Bauersachs & Widder 2008) além de hiperativação sustentada de fatores neuro-humorais que resulta na falência cardíaca (Beer et al, 2002; Rolim et al, 2007).

A falência cardíaca está associada a um prejuízo no metabolismo energético, à menor produção de trifosfato de adenosina (ATP) (Doenst et al, 2010) e presença de estresse oxidativo (Nojiri et al, 2006) oriundos da disfunção mitocondrial.

A mitocôndria exerce um papel fundamental na manutenção da viabilidade e funcionalidade do cardiomiócito sendo reconhecida por sua dinâmica decorrente de flutuações de oxigênio (O_2) e oscilações nas demandas metabólicas celulares, que acabam por modificar a forma, o número e a distribuição da organela para adaptar a célula à disponibilidade de nutrientes (Bereiter-Hahn, 1990; Carlucci, Lignitto, Feliciello, 2008).

A manutenção da função mitocondrial está associada ao conteúdo de cardiolipina. Este fosfolípido, localizado quase que exclusivamente nas mitocôndrias, é responsável por ancorar o citocromo c à membrana interna e fornecer estruturas essenciais e suporte funcional à proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa. No coração de mamífero, a maioria das moléculas de cardiolipina contém quatro porções de ácido linoleico (L4CL), um ácido graxo poliinsaturado essencial (Chicco et al, 2012).

Assim, tem sido demonstrada a importância dos ácidos graxos essenciais sobre o metabolismo cardíaco e, que, parte da perda de contratilidade observada após infarto do miocárdio pode ser explicada por disfunção mitocondrial. Entretanto, não está clara a relação causa-efeito entre função e dinâmica mitocondrial na progressão da disfunção ventricular e os benefícios do ácido linoleico. Dessa forma, faz-se necessário um estudo da inter-relação função-dinâmica mitocondrial em modelo animal de disfunção ventricular oriunda do infarto do miocárdio tratado com ácido linoleico.

1.1 Infarto do miocárdio

A oclusão cirúrgica de ramos da artéria coronária esquerda em ratos tem-se constituído em ferramenta de inestimável valor para mimetizar a fisiopatologia das alterações estruturais e funcionais cardíacas após o infarto isquêmico do miocárdio (IM) em humanos. Esse modelo foi descrito inicialmente por Heimburger, em 1946, passou por modificações progressivas e no início da década de 80, o método foi introduzido no Brasil na Faculdade de Medicina da Botucatu (Zornoff et al, 2009, Spadaro et al, 1984) sendo então disseminado em vários grupos de pesquisa pelo país.

Como resultado da oclusão aguda da artéria coronária, ocorre a interrupção do suprimento metabólico ao tecido e consequentemente, da fosforilação oxidativa mitocondrial. Com a persistência da isquemia, inicia-se o processo de morte das diferentes células que compõem o coração, estabelecendo a irreversibilidade da lesão (Sutton & Sharpe, 2000; Mill et al, 2011, Lee et al, 2012). Após o episódio isquêmico, modificações estruturais, bioquímicas e eletrofisiológicas são desencadeadas na área infartada e remota do coração na

tentativa de compensar os efeitos deletérios da doença no estágio inicial e manter o débito cardíaco adequado (Chatterjee, 2005; Mill et al, 2011).

A resposta compensatória aguda ocorre em decorrência da ativação do sistema nervoso simpático, do sistema renina-angiotensina e da liberação de fator natriurético atrial, o que causam: taquicardia, aumento da contratilidade miocárdica e vasoconstrição. Cronicamente, no entanto, essas compensações levam a disfunção ventricular, aumento do consumo de O_2 pelo miocárdio e aumento da resistência vascular periférica (Chatterjee, 2005).

Esses eventos acarretam no remodelamento cardíaco, que ocorrem nos três componentes principais do miocárdio: os miócitos, a matriz extracelular e a microcirculação. O remodelamento do ventrículo esquerdo após o IM refere-se então às modificações no tamanho, na forma e na função ventricular (Sutton & Sharpe, 2000; Zornoff et al, 2009). Os miócitos sofrem necrose já nos primeiros 45 minutos pós interrupção do fluxo coronariano o que leva a redução da massa contrátil ventricular (Leshnower et al., 2007). O tecido remanescente apresenta diminuição da contratilidade e do relaxamento o que justifica o baixo débito cardíaco encontrado nessa fase aguda do IM (Mill et al, 2011).

A diminuição da contratilidade miocárdica, mas principalmente do seu relaxamento acontece paralelamente a disfunção mitocondrial caracterizada por queda da produção de ATP após obstrução do fluxo coronariano, levando a redução da atividade da Na^+/K^+ ATPase (Koretsune et al, 1991). Com isso ocorre a elevação do sódio citosólico o que por sua vez reduz a atividade do trocador Na^+/Ca^{2+} , promovendo o aumento das concentrações de Ca^{2+} citoplasmático na diástole e diminuição da sensibilidade dos miofilamentos contráteis ao Ca^{2+} (Rolim et al, 2007; Doenst et al, 2010).

Os primeiro estudos relacionando à disfunção mitocondrial com esses eventos datam nas décadas de 60 e 70, quando cientistas observaram que as mitocôndrias começam a captar em excesso o Ca^{2+} citosólico (Rossi, Lehninger, 1964; Kerr, Wyllie, Currie, 1972). No entanto, essa sobrecarga de Ca^{2+} intramitocondrial resulta em prejuízo do balanço eletroquímico mitocondrial (Santulli et al, 2015), na abertura dos poros mitocondriais e no extravasamento de citocromo c para o citosol, processos esses que contribuem tanto para a disfunção mitocondrial quanto para a ativação de vias pró-

apoptóticas mediadas por caspases (Campos JC, 2012).

Quando o oxigênio está disponível em quantidades adequadas, a maior produção de ATP ocorre via fosforilação oxidativa, no entanto, durante a isquemia, a maior produção de energia passa a ser por via anaeróbia. O fator induzível por hipóxia 1-alfa (HIF1- α) é o principal fator de transcrição responsável por essa troca metabólica induzindo ação de enzimas glicolíticas e transportadores de glicose (aldolase A e piruvato quinase M). Além disso, o HIF1- α é responsável pela diminuição do consumo de oxigênio pela mitocôndria por ativar a piruvato desidrogenase quinase I e parar o ciclo do ácido cítrico (Ziello, Jovin e Huang, 2007).

1.2 Mitocôndria

A mitocôndria é uma organela de aproximadamente 1 μ m de tamanho e tem em seu significado toda a heterogeneidade da sua morfologia. Palavra originada do grego: *mitos*, linha e *chondros*, grão. Caracterizada pela primeira vez por Rudolph Albert Von Kolliker, em 1857, como compartimento citoplasmático granular com membrana própria. Palade e Sjostrand, em meados de 1950, através da microscopia eletrônica mostraram as características ultra estruturais da organela, conhecidas atualmente por duas membranas, uma externa e outra interna, um estreito espaço intermembranar e uma ampla matriz (Figura 1). A membrana mitocondrial externa (MME) separa o espaço intermembrana do citosol enquanto que a membrana mitocondrial interna (MMI) separa o espaço intermembranas da matriz mitocondrial. A integridade dessas duas membranas é essencial para a função mitocondrial.

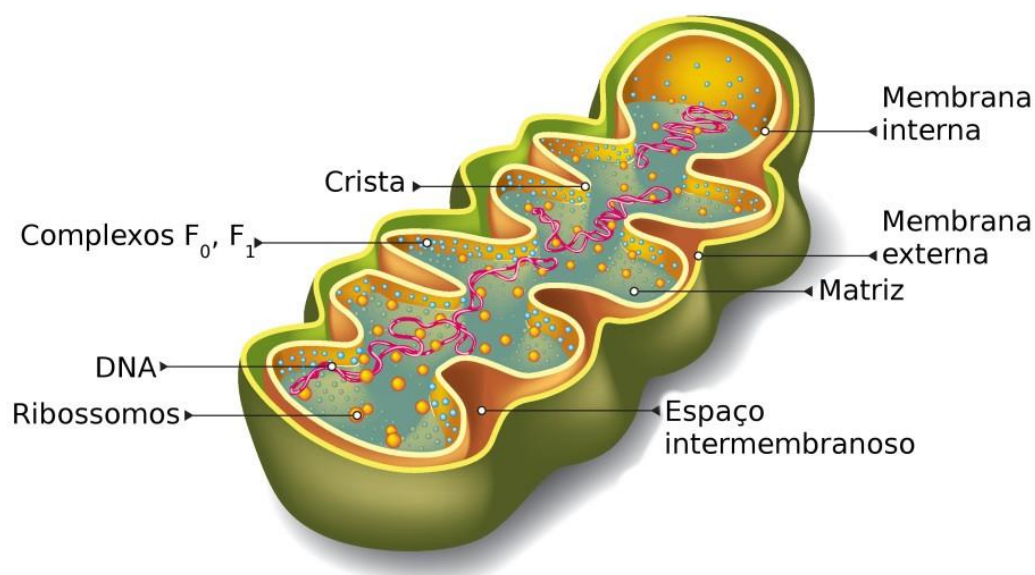


Figura 1 – Desenho esquemático da mitocôndria (Shutterstock.com [adaptado])

Devido a sua localização as mitocôndrias são classificadas de 3 maneiras, ou em subpopulações (Figura 2 A-C). A subpopulação intermiofibrilar (IFM) está firmemente inserida entre miofilamentos, se apresenta em toda extensão do sarcômeros entre as linhas Z e entre as junções do retículo sarcoplasmático. São organizadas longitudinalmente com forma alongada e tamanho de 1,5 a 2 μm . A subpopulação subsarcolemal (SSM) é facilmente identificada nas fibras musculares localizada logo abaixo do sarcolema e varia mais morfológicamente em até 4 μm de tamanho. Elas estão organizadas aleatoriamente e apresentam a forma oval, esférica e poligonal (Palmer, Tandler e Hoppel, 1977; Hollander, Thapa e Shepherd 2014). O terceiro tipo de subpopulação perinuclear (PNMs) que apresenta menor tamanho e forma arredondada em relação à IFM (Lukyaneko, Chikando e Lederer, 2009).

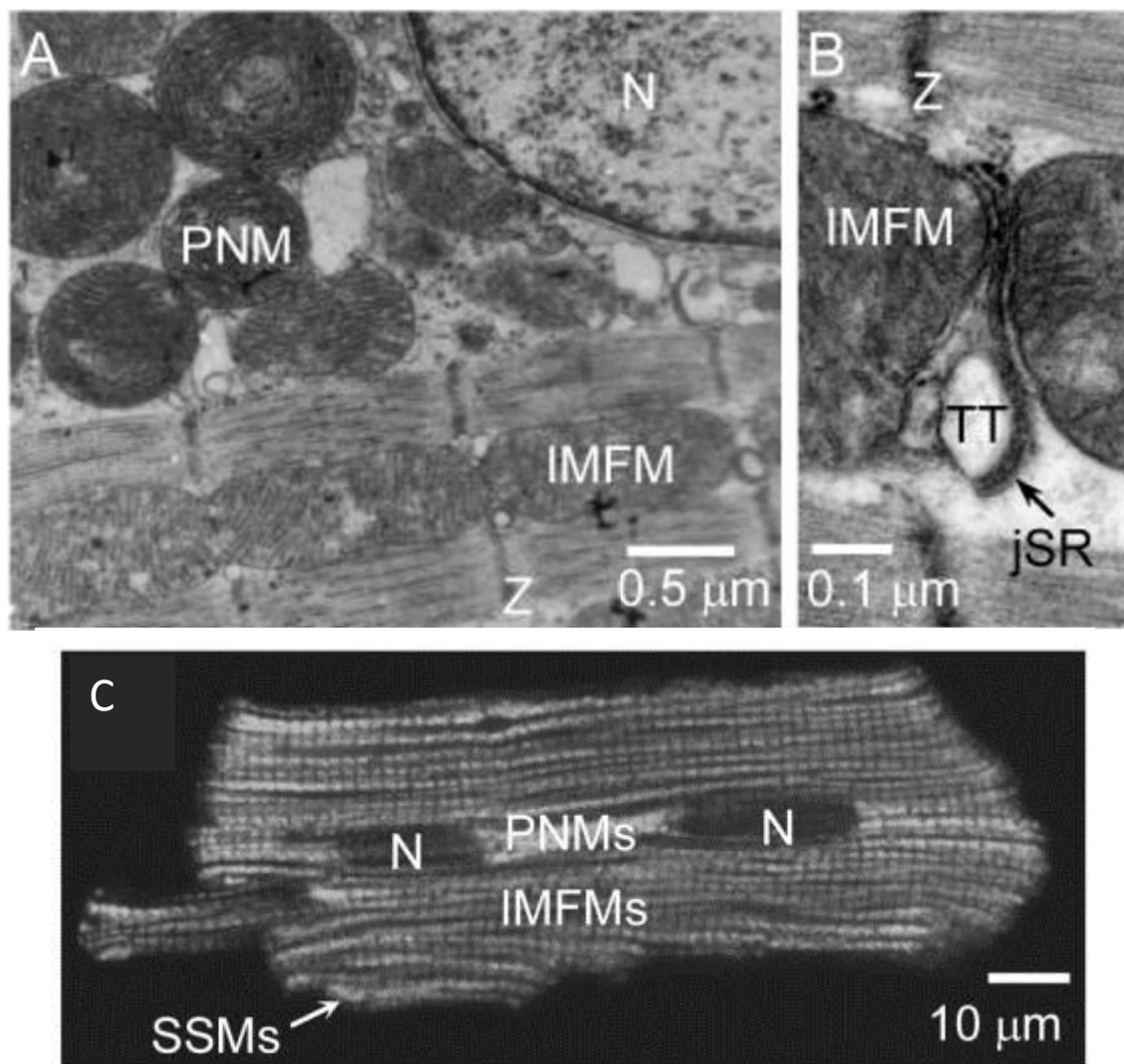


Figura 2 - Tipos de mitocôndrias dos cardiomiócitos ventriculares de ratos. Microfotografia eletrônica; Seção ultradelgada longitudinal, fixação convencional. Seção ultrafina longitudinal. (A) Mitocôndrias perinucleares e interfibrilares. (B) Mitocôndrias interfibrilares (C) mitocôndrias subsarcolemal (Lukyaneko, Chikando e Lederer, 2009).

A principal função bioquímica mitocondrial é a produção de energia uma vez que processos como a beta-oxidação, o Ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa ocorrem na mitocôndria (Mitchell e Moyle, 1967). Em 1964, Rossi e Lehninger mostraram as alterações morfofuncionais das mitocôndrias decorrentes da elevada concentração do íon cálcio e em 1972, Kerr, Wyllie e Currie adicionaram mais uma importante função a organela quando descrevem sua participação na ativação direta de vias pró-apoptóticas.

Na década de 90 iniciou-se uma nova etapa de estudos após Bereiter-Hahn caracterizar a dinâmica mitocondrial ao visualizar mudanças na sua morfologia e no seu rearranjo estrutural frente a diferentes estímulos.

Haller e Fuller (1977) descobriram o primeiro gene relacionado à plasticidade mitocondrial e mais tarde outros genes responsáveis pela dinâmica mitocondrial foram descobertos dando início então ao desenvolvimento dos primeiros modelos transgênicos (Liesa, Palacin, Zorzano, 2009).

Esses estudos pioneiros evidenciaram a importância da plasticidade mitocondrial na manutenção da função celular e a mitocôndria, que antes era considerada uma organela estática, passou a ser conhecidamente dinâmica caracterizada pela movimentação intracelular e regulação de sua arquitetura (Frederick, Shaw, 2007) em resposta a sinais intra ou extracelulares (ex. hiperativação neurohumoral); às demandas metabólicas que modificam sua forma, número e distribuição a fim de se adaptarem as necessidades funcionais e energéticas da célula e às necessidades de manutenção e eliminação do material genético mitocondrial e degradação da organela (Bereiter-Hahn, 1990; Carlucci, Lignitto, Feliciello, 2008). A dinâmica mitocondrial também foi relacionada ao metabolismo oxidativo, apoptose, autofagia e ciclo celular nos últimos anos (Liesa, Palacin, Zorzano, 2009; Ong et al, 2010).

1.3 Função Mitocondrial

As mitocôndrias são organelas encontradas em seres eucariotas e, por serem organelas centrais do metabolismo energético, são as principais responsáveis pelo metabolismo oxidativo dessas células e representam a principal fonte de produção de energia por meio da respiração. O conjunto central de reações envolvidas na produção de ATP é chamado de fosforilação oxidativa, e é auxiliado pelo ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs e pelo processo de beta-oxidação dos ácidos graxos (Mitchell e Moyle, 1967). Além disso, as mitocôndrias também têm funções paralelas à produção de energia: têm papel chave na sinalização de cálcio (Nicholls, 2005), atuam diretamente nos processos de apoptose, diferenciação, crescimento e proliferação celular (Jeong e Seol, 2008) e ainda na produção de espécies reativas de oxigênio (Eros)(Cadenas e Davies, 2000).

Aproximadamente mais de 95% da formação de ATP mitocondrial cardíaco é oriundo da fosforilação oxidativa de ácidos graxos, ficando o 5% restantes

derivados da glicólise e no GTP formado no ciclo do ácido cítrico. O coração tem um teor de ATP relativamente baixo (aproximadamente 1mM) e uma alta taxa de hidrólise de ATP, portanto, há formação de ATP no miocárdio, em condições normais, aproximadamente a cada 10 segundos. Aproximadamente 60-70% da hidrólise de ATP é utilizada na maquinaria contrátil e os restantes 30-40% são usados principalmente para o retículo sarcoplasmático Ca^{2+} -ATPase e outras bombas de íons. No coração saudável, a taxa de fosforilação oxidativa é exclusivamente ligada à taxa de hidrólise de ATP, de modo que o conteúdo de ATP permanece constante mesmo com grandes aumentos na demanda cardíaca (Stanley, Recchia e Lopaschuk, 2005).

A síntese de ATP, principal função da mitocôndria, acontece por meio do acoplamento da fosforilação oxidativa com a cadeia de transporte de elétrons (CTE). É na matriz mitocondrial que ocorrem as reações do ciclo de Krebs, sistema de enzimas responsável pela oxidação de carboidratos, gorduras e outros substratos que gera energia armazenada na forma de elétrons provenientes da dissociação dos átomos de hidrogênio em prótons e elétrons, que foram transferidos para o O_2 através de uma série de complexos proteicos (complexos I, II, III, IV – citocromo c oxidase e V – ATP sintase) (Mitchell e Moyle, 1967).

Outro aspecto importante é que piruvato (produto da glicólise), glutamato, malato e palmitoil, são degradados no ciclo de Krebs para redução do NAD^+ e do FAD. (Gilkerson, Selker e Capaldi, 2003).

O gradiente eletroquímico de prótons gerado durante o transporte de elétrons é utilizado para impulsionar a conversão de ADP (adenosina difosfato) + Pi (fosfato inorgânico) em ATP, por meio do complexo ATP sintase (Mitchell e Moyle, 1967).

A partir dessas informações e de maneira simplificada, durante o ciclo de Krebs, os elétrons de reações oxidativas reduzem carreadores específicos, NAD^+ (nicotinamida adenina nucleotídeo) e FAD (flavina adenina dinucleotídeo), formando NADH e FADH_2 , respectivamente. Os elétrons provenientes de NADH são substratos do complexo I, que na sequência é oxidado, promovendo a redução da coenzima Q. O Ubiquinol então doa os elétrons da oxidação de substratos no complexo I para o sítio Q_0 do complexo

III. Já os elétrons de FADH_2 são transferidos via complexo II direto para a coenzima Q, novamente cedendo 2 elétrons que serão transportados pela ubiquinona ao sítio Q_0 do complexo III. Os elétrons da coenzima Q são transferidos para o complexo III que reduz o citocromo c, uma proteína periférica de membrana. Finalmente, o citocromo c reduz o complexo IV que irá transferir elétrons para o O_2 ,ceptor final da CTE. A passagem de elétrons por estes carreadores acompanha uma liberação de prótons para o espaço intermembranas da mitocôndria, gerando um gradiente eletroquímico que favorece a reentrada de prótons por meio da ATP sintase, esta por sua vez utiliza a força próton-motriz para fosforilar ADP, gerando ATP. A força próton-motriz é também utilizada para o transporte de íons fosfato para o interior da organela, além da troca de ATP intramitocondrial por ADP extramitocondrial (Mitchell e Moyle, 1967)(figura 3).

Acredita-se que as duas subpopulações mitocôndrias IFM e SSM geram ATP para diferentes funções principais. Pela íntima localização com o sarcolema entende-se que as SSMs geram ATP para o transporte ativo da membrana e a IFM para a contração das miofibrilas, visto que essas se localizam entre as miofibrilas (Hollander, Thapa e Shepherd 2014).

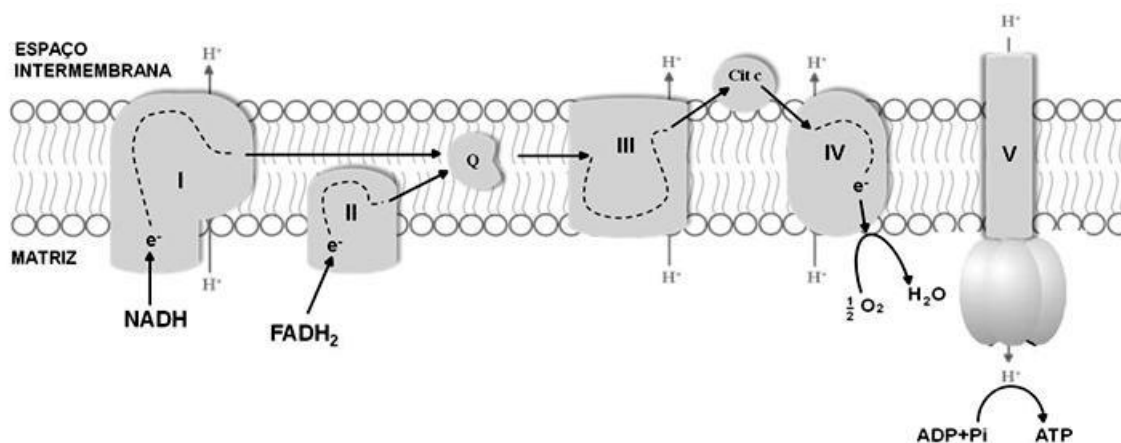


Figura 3 - Esquema ilustrativo da organização e funcionamento da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Complexos I, II, III, IV – citocromo c oxidase e V – ATP sintase; e^- - elétrons; H^+ - íons hidrogênio; NADH – nicotinamida adenina nucleotídeo reduzida; FADH_2 – flavina-adenina dinucleotídeo reduzida; Q – coenzima Q; Cit c – citocromo c (Adaptado de Tahara et al., 2009) (Campos, 2012).

No entanto, situações que provoquem aumento no consumo de O_2 e/ou no fluxo de elétrons pela CTE (Sen, 1995), e/ou no potencial de membrana

interna mitocondrial (Skulachev, 1998) geram extravasamento de elétrons entre os complexos I e III. Neste processo ocorre a formação de espécies reativas de O_2 , pois ao invés dos elétrons serem doados para o próximo componente da cadeia e chegar ao seuceptor final, o citocromo c oxidase (complexo IV), são doados para o O_2 , formando o ânion superóxido (O_2^-). Esse radical livre capaz de causar dano oxidativo em diversos componentes mitocondriais e celulares.

A produção exacerbada de EROs pode inativar diretamente proteínas mitocondriais ou contribuir para a oxidação de lipídeos e carboidratos, gerando uma disfunção mitocondrial (Friguet, Bulteau, Petropoulos, 2008).

A mitocôndria também participa no processo de morte celular programada, principalmente quando ocorrem alterações nas concentrações de Ca^{2+} . O íon cálcio é de extrema importância na regulação de sinais em processos patológicos na mitocôndria, pois causam modificações no interior da organela e resultam na alteração do potencial de membrana mitocondrial (Kadenbach et al, 2011), na abertura dos poros (transitório ou permanente) de permeabilidade mitocondrial (Murgia et al 2009, Lu et al, 2016) e na liberação de importantes proteínas próapoptóticas para o citosol, como o citocromo c (Szabadkai et al, 2006; Elmore, 2007).

1.4 A Cardiolipina

A cardiolipina é um fosfolípido tetra-acil dimérico encontrado exclusivamente nas mitocôndrias, onde fornece suporte estrutural e funcional crítico às proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa e na sinalização apoptótica por ligar o citocromo c a membrana mitocondrial interna. É formada por três moléculas de glicerol e quatro cadeias de ácidos graxos formando uma ultraestrutura ligeiramente cônica implicada em diversos processos mitocondriais (Houtkooper et al, 2008, Claypool e Koehler, 2012).

As cadeias de ácidos graxos da cardiolipina são bastante específicas, sendo composta predominantemente por cadeias insaturadas de 18 carbonos. A maioria das espécies moleculares de cardiolipina presente no coração de mamíferos saudáveis contém 4 cadeias acil-linoleico (L4CL) (Claypool e Koehler, 2012), constituindo 80 a 90% da sua estrutura e esta corresponde de

16 a 20% dos fosfolipídios da membrana interna mitocondrial. Sendo assim, a cardiolipina tem grande importância na função mitocondrial por interagir com proteínas da membrana mitocondrial de forma modulatória e estrutural, em especial as da cadeia respiratória (Chicco e Sparagna, 2007).

A cardiolipina está envolvida com a manutenção da fluidez da membrana mitocondrial e a sua estabilidade osmótica, sendo responsável pela manutenção do gradiente eletroquímico de prótons entre o espaço intermembranas e o interior da mitocondria (Chicco e Sparagna, 2007). Assim esse fosfolipídio participa da fosforilação oxidativa (ao receber os elétrons de alta energia derivados da oxidação de gorduras e carboidratos no ciclo do ácido cítrico) e da cadeia respiratória, auxiliando na formação do gradiente eletroquímico onde o efluxo dos prótons em direção ao interior da mitocôndria é utilizada pela ATP sintase para catalisar a síntese de ADP + fosfato em ATP (Alberts, 2004).

A perda de conteúdo de cardiolipina e/ou as alterações na composição da sua cadeia acil têm sido associadas à disfunção mitocondrial em múltiplos tecidos e em diversas condições patológicas, incluindo isquemia, hipotireoidismo, envelhecimento e insuficiência cardíaca. Desordens no metabolismo da cardiolipina têm sido apontadas como um fator causador primário da miopatia cardio-esquelética conhecida como síndrome de Barth, ressaltando o importante papel da cardiolipina na saúde humana e na doença.

1.5 O ion Ca^{2+} e sua relação com a mitocôndria – Canal Uniplex

O Ca^{2+} e a mitocôndria estão indissociavelmente ligados à função e disfunção cardíaca. Ele é o segundo mensageiro intracelular que controla a expressão gênica a fim de regular a contração cardíaca, ativar o metabolismo e iniciar a morte celular programada. Em condições fisiológicas o cálcio mitocondrial funciona como sinalizador para aumentar a produção de energia ativando as 3 desidrogenases do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (piruvato desidrogenase, isocitrato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase), bem como a produção de ATP (Figura 4). Em condições de sobrecarga de Ca^{2+} citosólico, essa sinalização, ao invés de aumentar o metabolismo, envolve os caminhos da morte mitocondrial pois desencadeia a abertura do poro de

transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP), levando à permeabilização da membrana interna mitocondrial, disfunção mitocondrial e morte celular (Kwong, 2017).

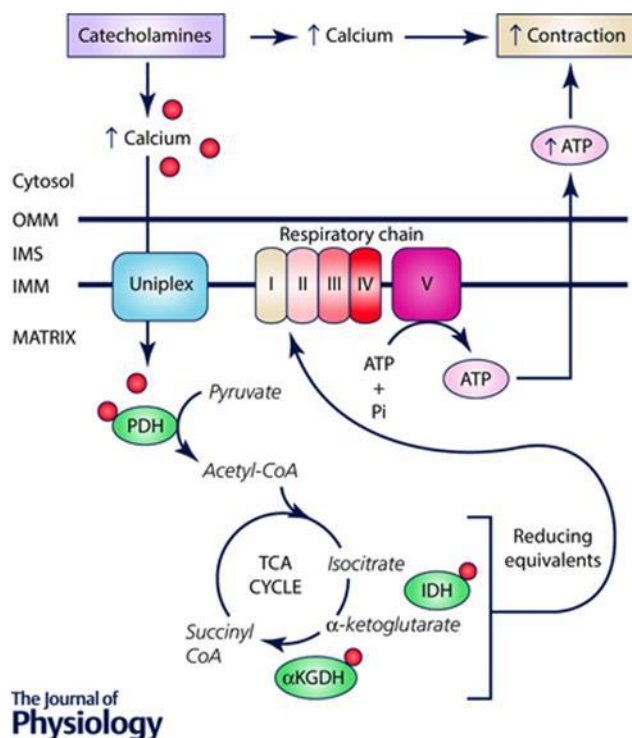


Figura 4 – Sinalização de cálcio mitocondrial (Kwong, 2017).

Um componente-chave da sinalização mitocondrial de Ca^{2+} é o complexo mitocondrial de Ca^{2+} uniporter (MCU) (uniplex), um transportador de Ca^{2+} interno da membrana e a via principal da entrada mitocondrial de Ca^{2+} . O uniplex é um caminho importante de influxo mitocondrial de Ca^{2+} que facilita o transporte dependente do potencial de membrana de íons Ca^{2+} através da membrana interna mitocondrial na matriz (Kwong, 2017). É um canal multimérico de 480kDa. Em 2013, Raffaello e colaboradores, através de estudos computacionais, sugeriram que o canal uniplex é tetramérico. No entanto, Oxenoid et al (2016), analisaram por ressonância nuclear magnética associada a microscopia eletrônica a estrutura do uniplex em *Caenorhabditis elegans* e descobriram uma organização pentamérica.

O Uniplex é constituído do MCU (Baughman et al., 2011; De Stefani et al., 2011) e elementos reguladores descritos a seguir (figura 5):

- *mitochondrial calcium uptake 1 e 2* (MICU1 e MICU2): proteínas sensíveis ao cálcio que modulam a abertura do canal em baixa e alta concentração do cálcio citosólico (Perocchi et al, 2010; Mallilankaraman et al, 2012b; Plovanich et al, 2013; Patron et al, 2014);
- regulador essencial do MCU (EMRE): regula o uniplex ligando o MCU ao MICU1/2 além de regular a atividade uniplex servindo como um sensor de cálcio de matriz (Sancak et al, 2013; Vais et al, 2016):
- *mitochondrial calcium uniporter b* (MCUb): atua como um repressor endógeno do transporte de cálcio dependente de uniplex ao integrar-se no poro oligomérico MCU (Raffaello et al, 2013):
- *solute carrier family 25 member 23* (SLC25a23): transportador Mg-ATP/Pi da membrana interna da mitocôndria que modula o influxo de cálcio por interagir com MCU e MICU1 e induz stress oxidativo mediando a morte celular (Hoffman et al, 2014).
- mitochondrial calcium uniporter regulator 1 (MCUR1) – proteína de ligação entre uniplex e a cadeia respiratória (Tomar et al, 2016).

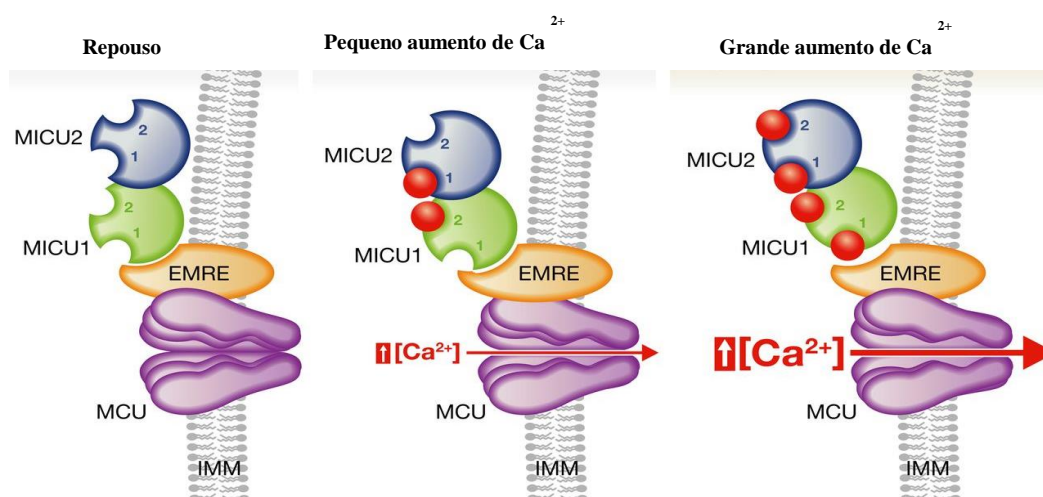


Figura 5: O complexo uniporter é composto pelo canal uniporter (MCU), MICU1 e MICU2, que são conectados pelo regulador essencial MCU (EMRE). (Adaptado de Ahuja & Muallem 2014).

1.6 Alterações da função mitocondrial durante a disfunção ventricular por infarto agudo do miocárdio

Para que a viabilidade celular ocorra faz-se necessário a manutenção da homeostase mitocondrial visto que as mitocôndrias representam aproximadamente um terço do volume celular do cardiomiócito cardíaca e são fontes de radicais livres e fatores pró-apoptóticos (Rosca e Hoppel, 2009). Em adição, são essenciais para o bombeamento cardíaco por serem fonte primária de energia na forma de ATP, fornecendo substrato energético para o funcionamento da maquinaria contrátil.

Sendo assim, a função mitocondrial é regulada, de maneira transiente, de acordo com a necessidade energética celular por meio de vias de sinalização que envolvem mensageiros intermediários, como o Ca^{2+} e as EROs a fim de promover quantidade de ATP adequado ao cardiomiócito (Campos JC, 2012).

Anormalidades mitocondriais em decorrência do infarto agudo do miocárdio, não apenas diminuem a capacidade para gerar ATP, mas também podem estar diretamente ligadas à lesão e morte de cardiomiócitos e, portanto, à progressão da doença. As mitocôndrias anormais são uma das principais fontes de produção de EROS, as quais podem induzir dano celular programado através da liberação do citocromo c no compartimento citosólico e a ativação das caspases que servem como mediadores primários da apoptose.

A apoptose é um mecanismo de morte celular programada, que pode ocorrer como resultado da oclusão aguda a artéria coronária no miocárdio isquêmico, assim como a necrose, e é fundamental para o processo de remodelamento cardíaco (Palojoki et al, 2001). Existem dois caminhos apoptóticos, a via extrínseca, mediada pelo receptor da morte celular (*death receptor*), e a via intrínseca, mediada pela mitocôndria. A via extrínseca está envolvida quando “death receptors” na membrana externa, como o fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), são envolvidos e ativam as caspases.

A via intrínseca é ativada durante situações de estresse, como infarto do miocárdio e leva a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria permitindo a liberação de proteínas do espaço intermembranar para o citosol.

Algumas proteínas são consideradas inofensivas ao processo de morte celular, no entanto a liberação do citocromo c promove a morte celular promovendo a ativação de caspases.

O citocromo c, é uma proteína essencial à cadeia transportadora de elétrons associada ao lado externo da membrana interna da mitocôndria onde se fixa. Sua fixação é mantida pela cardiolipina (Heather et al, 2010) e sua liberação ocorre devido a transição na permeabilidade mitocondrial, alteração no potencial de membrana mitocondrial e ruptura da sua membrana externa (Parsons e Green, 2010) além de aumento da liberação de H_2O_2 (Cai e Jones, 1998), um dos principais desencadeadores de morte celular (Kowaltowski, 2004).

1.5.1 Seletividade dos substratos mitocondrial

A oxidação de ácidos graxos mitocondrial pelo coração humano adulto saudável é responsável por 60-80% da produção de ATP cardíaco, seguido de menores contribuições de glicose, lactato e corpos cetônicos (Aubert et al, 2013).

Com o infarto do miocárdio a oxidação de ácidos graxos e a capacidade oxidativa da mitocôndria diminuem, sendo difícil manter a produção suficiente de ATP, por isso ocorre mudança de oxidação de ácidos graxos para via glicolítica (Sack et al, 1996). Acredita-se que esse fato ocorra pois existe *downregulation* do PPAR α , o fator de transcrição expresso no coração e responsável por transportar ácido graxos para mitocôndria (Goikoetxea et al, 2006). Associado a isso ocorre diminuição do fator de transcrição responsável pela biogênese mitocondrial PGC1- α (Sihag et al, 2009; Lehman et al, 2000). Como esses fatores de transcrição têm um papel crítico na regulação da produção de energia mitocondrial cardíaca, esses dados sugerem que a diminuição da atividade de PPAR α (Sack et al, 1996) e PGC-1 α (Sihag et al 2009) pode ser um precursor importante que leva à diminuição da oxidação de ácidos graxos durante o infarto do miocárdio

1.5.2 Aumento na produção de EROs

A produção de EROs mitocondrial ocorre em vários locais ao longo da membrana interna da mitocôndria e também na matriz mitocondrial por componentes do ETC e do ciclo de Krebs (Orr et al, 2013), principalmente entre os complexos I e III (Murphy, 2009). Embora as EROs sejam tipicamente associadas a estados patológicos, pequenas quantidades podem provocar sinalização adaptativa e criar respostas benéficas e compensatórias (Brown et al, 2016).

Segundo Bartz et al (2015), quando o dano oxidativo torna-se um problema, mecanismos compensatórios trabalham na tentativa de preservar o tecido evitando apoptose e/ou necrose. Sendo assim, o controle contínuo da qualidade mitocondrial se faz necessário para garantir a ótima função da organela. Esse controle de qualidade envolve os processos de fusão-fissão, autofagia e biogênese mitocondrial com ativação do fator nuclear respiratório (NRF-1) e dos seus co-ativadores PGC-1 α , PGC-1 β e PRC. Esses fatores de transcrição nuclear e seus co-ativadores são responsáveis por regular proteínas envolvidas nas muitas funções mitocondriais incluindo fosforilação oxidativa e homeostase do cálcio, além de estimularem a expressão do Tfam (fator de transcrição mitocondrial A), uma proteína na matriz mitocondrial essencial para a replicação do DNA da mitocôndria (Llimona, 2011, Bayeva et al, 2014).

O PGC-1 α aumenta também os níveis de proteínas a citocromo c oxidase IV e a citocromo c. O citocromo c é um importante fator regulatório para a liberação de EROs mitocondrial (Zhao e Xu, 2004; Pereverzey et al 2003). Com a perda do citocromo c ocorre uma diminuição da velocidade respiratória e a mitocôndria perde uma proteína capaz de receber elétrons de pontos intermediários da cadeia respiratória, evitando sua transferência para o O₂ (Kowaltowski, 2004).

As EROs produzidas pela mitocôndria são dependentes do potencial da membrana mitocondrial. O aumento da expressão das proteínas desacopladoras, no infarto do miocárdio, pode desencadear um mecanismo compensatório para reduzir a produção de EROs por "desacoplamento para sobreviver", pois uma redução no potencial da membrana mitocondrial é

postulado para uma menor emissão de EROs de mitocôndria (Brown et al, 2016).

Acredita-se que a diminuição da geração de EROs em mitocôndrias ligeiramente desacopladas esteja relacionada ao aumento das taxas de respiração, que reduz o tempo de vida de intermediários reduzidos que doam elétrons para o O_2 . É possível também que o aumento das taxas respiratórias cause uma diminuição na tensão de oxigênio na mitocôndria, prevenindo assim a formação de O_2^- (Skulachev, 1997).

1.5.3 Anormalidades na ETC mitocondrial

Uma diminuição nos complexos da cadeia transportadora de elétrons é observada principalmente nos complexos I e/ou IV em modelos animais e humanos infartados. Isso parece estar associado à geração de EROs, que provoca o desacoplamento das proteínas envolvidas nos supercomplexos funcionais da mitocôndria (Lapiente-Brun et al, 2013; Maranzana et al, 2013).

Observa-se também o desacoplamento do grupo coenzima Q (ubiquinol/ ubiquinona CoQ) que compreende uma coenzima de ciclagem redox encontrada. A CoQ é sintetizada e sofre uma redução de dois elétrons a partir de substratos nos complexos I e II e, em seguida, é oxidada à medida que doa elétrons no complexo III (Nicholss e Ferguson, 2013). Problemas na CoQ podem retroalimentar elétrons em direção ao complexo I o que resulta em aumento da geração de EROs (Chouchani et al, 2014).

A disfunção da ETC também está envolvida nas alterações observadas nos fosfolípidos de membrana mitocondrial aberrantes em corações infartados. Um fosfolípido de membrana primordial para o funcionamento ideal da ETC e cujo conteúdo e composição são alterados no infarto do miocárdio é a cardiolipina. A cardiolipina encontra-se na membrana mitocondrial interna e, ao contrário da maioria dos fosfolípidos que tem duas caudas acilas, a cardiolipina possui quatro. Em corações de mamíferos, estas cadeias são enriquecidas com ácido linoleico (18:2) (Brown et al, 2016). A diminuição da cardiolipina é observada em crianças (Chatifiel et al, 2014) e adultos (Saini-chohan et al, 2009, Sparagnan e Lesnefsky, 2009) com insuficiência cardíaca. A cardiolipina é essencial para a atividade dos complexos presentes na ETC, nos

transportadores de membrana, na homeostase de íons mitocondriais e na produção de EROs (Chicco e Sparagnan, 2007). Dado que a maioria dos complexos mitocondriais associados à produção de energia são oligômeros compostos por muitas subunidades, a cardiolipina atua como "fixador" molecular que retém essas subunidades (Pfeiffer et al, 2003). Os estudos que visam a cardiolipina provavelmente melhorarão transporte de elétrons através do ETC e, ao fazê-lo, pode ser benéfico no tratamento de disfunções cardíacas.

1.5.4 Alterações nos Poros Mitocondriais

A mitocôndria é composta por diversos poros em sua membrana interna e externa que permitem moléculas passarem livremente. A membrana externa é altamente permeável a pequenas moléculas que passam livremente entre o citoplasma celular e o espaço intermembrana (Patergnani et al, 2011). De modo inverso, a membrana interna, que contém complexos da cadeia respiratória, ATP sintase e outras enzimas, é quase impermeável, mesmo a íons como Ca^{2+} e H^+ (Fornier et al, 2004). Para atingir a matriz mitocondrial esses íons contam com 3 alternativas: o canal uniporter mitocondrial (MCU), o primeiro e talvez o mais importante (Baughman et al, 2011), o modo rápido de captação de Ca^{2+} (RaM) que em níveis fisiológicos são mais eficientes na sua absorção e centenas de vezes mais rápido do que a MCU (Bazil e Dash, 2011) e, por último, o receptor de rianodina mitocondrial tipo 1 (mRyR1) (Ryu et al, 2011).

Assim como as vias de influxo, foram descritas até o momento três vias de efluxo: o trocador iônico mitocondrial $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ (mNCX), forma predominante de efluxo de Ca^{2+} das mitocôndrias; o trocador iônico mitocondrial $\text{H}^+ - \text{Ca}^{2+}$ (HCX) e o poro de transição da permeabilidade mitocondrial (mPTP). O mPTP é um poro inespecífico que se abre em resposta ao aumento dos níveis de cálcio e ao stress oxidativo e está associado à produção de EROs, morte celular apoptótica e disfunção mitocondrial. Estudos mostram que o bloqueio do mPTP com ciclosporina foram eficazes nas patologias cardíacas (Weinbrenner et al, 1998). No entanto, estudos recentes sugerem que a abertura transitória do mPTP, pode ser um mecanismo de

"reposição" fisiológico para prevenir a sobrecarga de cálcio mitocondrial. Se a abertura desses poros pode ser um mecanismo compensatório normal semelhante a "válvulas de liberação de pressão", o conceito de tratamento de IC ao bloqueá-los torna-se questionável.

Aberturas raras e transitórias do mPTP foram observados em mitocôndrias individuais de cardiomiócitos de corações infartados e foram associadas à despolarização transitória da mitocôndria e à liberação de cálcio mitocondrial. No entanto, apesar do peso das evidências apontarem progressivamente para a maior importância para esse fenômeno e criação desses poros, a composição molecular exata não está bem estabelecida (Monteiro et al, 2003). O mPTP parece ser composto de dímeros de ATP sintase (complexo V) e ser controlado pelo teor de cálcio da matriz mitocondrial através da ciclofilina D (Goorgio et al, 2013; Carraro et al, 2014), uma peptidil-prolil cis-trans isomerase localizada na membrana externa da mitocôndria. Quando ativada por íons cálcio, promove o mPTP liberando o citocromo c envolvido na apoptose celular ou morte celular programada, como mecanismo de defesa (Elrod et al, 2010).

1.6 Homeostase Mitocondrial e Mecânica Cardíaca

Alterações iônicas no interior das mitocôndrias têm sido observadas em modelos de animais infartados. Um íon de suma importância para o funcionamento mitocondrial e para a mecânica cardíaca é o cálcio. As mitocôndrias influenciam diretamente a dinâmica de cálcio celular uma vez que todos os mecanismos de liberação e captação de cálcio citosólico são dependentes da energia e de EROs. Alterações na concentração de cálcio celular levam ao prejuízo no mecanismo acoplamento excitação-contração observado em disfunções cardíacas, contribuindo para a piora da mecânica cardíaca e para a arritmogênese.

Em situações de doença, estima-se que a homeostase anormal de cálcio contribua para o desenvolvimento e instalação da disfunção cardíaca como aquela presente na insuficiência cardíaca decorrente do infarto do miocárdio (Houser et al., 2000; Braunwald, 2013). Estudos mostraram que a sinalização do cálcio entre a superfície da membrana sarcolemal e o retículo

sarcoplasmático encontra-se prejudicada, em outras palavras, o influxo de cálcio através dos canais para cálcio tipo L são menos efetivos em disparar a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático em miócitos hipertrofiados e insuficientes (Orchard & Brette, 2008). Com isso, a formação das pontes cruzadas e conseqüentemente a contração cardíaca pode ser prejudicada (Mill et al., 1998; Stefanon et al., 2013, Braunwald, 2013).

Assim como as alterações no influxo de cálcio são necessárias para uma perfeita sístole as modificações nos mecanismo de extrusão de cálcio também podem interferir na contratilidade cardíaca, visto que interferem na concentração intracelular do cálcio (Bers, 2014). O transporte de cálcio para fora do citosol envolve a bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA2a), o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), a bomba de cálcio do sarcolema e o canal uniporte de cálcio mitocondrial (Lederer et al., 2013, Bers, 2014).

A maior parte da recaptação de cálcio, obrigatório para o relaxamento diastólico, ocorre através da SERCA2a, que apresenta menor atividade em corações infartados (Gorski et al 2015). Além disso, o aumento das EROs pode oxidar as proteínas associadas ao canal de liberação de cálcio do receptor de rianodina, o que pode levar ao vazamento de cálcio do retículo sarcoplasmático durante a diástole (Belevych et al, 2009). O aumento dos níveis intracelulares de sódio em corações infartados também contribui para o mau funcionamento do NCX. Como o cálcio é fundamental para a manutenção da sua bioenergética, a sobrecarga de sódio altera o fluxo de cálcio mitocondrial e prejudica a oferta-demanda bioenergética encontrada em infartados (Maack et al, 2006; Lopez-Crisoto et al, 2017). Especula-se que os mecanismos envolvidos na redução da liberação do cálcio pelo retículo sarcoplasmático se deva a redução da recaptação de cálcio pela SERCA2a, aumento na extrusão de cálcio pelo NCX e/ou aumento no vazamento de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (Lederer et al., 2013; Bers, 2014). É importante ressaltar que o aumento da expressão da fosfolambam (PLB) está associado a diminuição da afinidade da SERCA2a pelo cálcio (Frank et al., 2003), resultando em prejuízo na recaptação desse íon durante a diástole. O PLB é o inibidor endógeno da SERCA2a que quando fosforilado deixa de inibir a bomba permitindo o influxo ativo de cálcio para dentro do retículo sarcoplasmático. Desta forma, se torna

uma importante proteína reguladora do relaxamento do miocárdio durante a diástole, por acelerar a remoção intracelular de cálcio, além de contribuir na manutenção do conteúdo de cálcio sarcoplasmático (Bers, 2008).

Em conjunto, essas alterações na dinâmica do cálcio, prolongam o tempo despendido durante a fase de relaxamento o que ocasiona o aumento da rigidez da câmara cardíaca e conseqüentemente a redução da geração de níveis satisfatórios de pressão sistólica e restrição diastólica (Gwathmey et al, 1987; Sikkkel et al, 2014).

1.7 Interação entre a função mitocondrial e o retículo sarcoplasmático

O acoplamento do retículo sarcoplasmático (RS) e a mitocôndria foi o primeiro tipo de interação entre organelas descrito, e foi reconhecido como sendo necessário para troca de lipídios e transferência de íon cálcio (Rizzuto et al, 1998; Vance, 1990). No ponto de contato entre as organelas, o Ca^{2+} é transferido diretamente para mitocôndrias do RS e, quando na matriz mitocondrial, estimula a atividade do ciclo de Krebs e a síntese de ATP (Cardenas et al, 2010).

A distância entre RS e MME é de quase 40 nm e a concentração intramitochondrial de Ca^{2+} cai rapidamente à medida que a distância entre a organela e as linhas Z e o túbulos transversos em pacientes cardiopatas aumenta (Lu et al, 2010; Sharma et al, 2000) e que por sua vez altera o metabolismo cardíaco e trabalho do Ca^{2+} (Gutierre et al, 2014).

Em infartados, o aumento do efluxo de Ca^{2+} mitocondrial ou a redução da absorção de Ca^{2+} mitocondrial, pode ser considerado mecanismo compensatório ou adaptativo a fim de tamponar o vazamento de Ca^{2+} aumentado no RS o que prejudicaria os cardiomiócitos e a homeostase (Lopez-Crisoto et al, 2017).

A comunicação física e funcional entre as mitocôndrias e o RS, e a dinâmica mitocondrial equilibrada são reguladores essenciais da função mitocondrial, do metabolismo celular e da homeostase de cálcio (Lopez-Crisoto et al, 2017).

Alterações na comunicação do RS e na morfologia da rede mitocondrial implicam em várias patologias cardiovasculares, incluindo insuficiência cardíaca, doença arterial coronariana e hipertensão pulmonar (Lopez-Crisoto et al, 2017).

A hipertrofia cardíaca mal adaptativa que leva à insuficiência cardíaca produz múltiplos distúrbios funcionais, incluindo alterações na dinâmica mitocondrial, que consiste na regulação de sua estrutura (morfologia e distribuição) e em sua conectividade, mediados pela fusão e fissão mitocondriais.

Em modelos *in vitro* de hipertrofia cardíaca, são observados níveis reduzidos de mitofusina2 (Mfn2). A Mfn 2 é a proteína mais propensa a se envolver na ligação entre RS e mitocôndrias no coração. A redução dos níveis de Mfn 2 leva a um comprometimento da manipulação de Ca^{2+} mitocondrial e no aumento da produção de EROs corroborando a idéia de que o acoplamento RS-mitocôndria modula o metabolismo energético no tecido cardíaco (Lopez-Crisoto et al, 2017).

As mitofusinas 1 e 2 (Mfn1 e Mfn 2) estão localizadas na superfície das mitocôndrias. Quando duas mitocôndrias adjacentes interagem umas com as outras ocorre fusão da membrana mitocondrial externa (MME). Essa dinâmica mitocondrial é mediada pela ação da GTPase, que controla também a *optic atrophyprotein 1* (OPA1), uma proteína de 120kDa, presente na membrana interna da mitocôndria (MMI) e no espaço intermembranas, onde é responsável por manter a estrutura das cristas e também participar da fusão da MMI (Meeusen et al, 2006; Frezza et al, 2006, Liesa, Palacin, Zorzano, 2009).

A deleção completa de ambas as mitofusinas em corações adultos leva a uma função cardíaca gravemente comprometida, com aumento do tamanho da câmara, diminuição da fração de encurtamento e aumento do volume diastólico final do ventrículo esquerdo (Chen, Liy & Dorn, 2011; Papanicolaou et al, 2012).

1.8 Ácidos graxos – ácido linoleico

Após o infarto do miocárdio a membrana cardíaca sofre alterações na sua composição lipídica (Le et al 2014). Em 1987 e em 1991, Chien et al e

Okumura et al, respectivamente, demonstraram que os fosfolipídeos (FL) e os ácidos graxos (AG) da membrana celular também sofreram alterações em decorrência do infarto do miocárdio.

Muitos lipídios possuem ácidos graxos como constituinte, que são ácidos carboxílicos que possuem uma cadeia carbônica geralmente não ramificada (apolar) e uma única carboxila (polar) (Chemin & Mura, 2010).

Os ácidos graxos são cadeias de hidrocarbonetos que apresentam um grupo carboxila na cabeça (δ) terminal e um grupo metila na cauda (n) final. O número de carbonos na cadeia e o tipo de ligação entre estes dará origem a diferentes tipos de ácidos graxos (Hardman, 2004).

A nomenclatura dos ácidos graxos refere-se ao número de átomos de carbono, quantidade e posição das duplas ligações em relação ao grupo metila (Ratnayake e Galli, 2009). Os ácidos graxos saturados possuem apenas ligações simples entre seus carbonos. Os ácidos graxos que contêm uma (1) ou mais duplas ligações na cadeia são chamados de ácidos graxos insaturados (AGI). Quando o ácido graxo contém uma (1) dupla ligação é chamado de ácido graxo monoinsaturado (AGMI) e se apresentarem duas (2) ou mais duplas ligações é chamado de ácido graxo poliinsaturado (AGPI) (Yaquop, 2004; Ratnayake e Galli, 2009).

De acordo com a posição da dupla ligação o ácido graxo pode ser classificado pelo sistema omega (ω) de nomenclatura ou o termo “n” (em minúsculo). Essas classificações referem-se à posição da primeira dupla ligação do ácido graxo relativa ao grupo metila ($-\text{CH}_3$) da molécula de hidrocarboneto (Mahan & Escott-Stump, 2005). Em quase todos os ácidos graxos insaturados que ocorrem naturalmente, as duplas ligações estão na configuração cis e normalmente são posicionados no n-3, n-6 ou n-9 em relação ao átomo de carbono do grupo metila (Ratnayake e Galli, 2009).

Em mamíferos, incluindo seres humanos, ácidos graxos saturados e monoinsaturados podem ser obtidos pela dieta ou, podem ser sintetizados pela síntese “*de novo*” de ácido graxo. No entanto, os mamíferos não conseguem sintetizar ácidos graxos com a dupla ligação no carbono (n) 6 ou 3, por esta razão os ácidos graxos n-6 e n-3, são considerados ácidos graxos essenciais (AGE) e devem ser obtidos na dieta (Yaquop, 2004; Hardman, 2004;

Simopoulos, 2006; Yaqoob e Calder, 2007).

Os AGPI n-6, a primeira dupla ligação do ácido graxo está presente no 6° carbono a partir do carbono terminal (Figura 6). Este é consumido principalmente como ácido linoléico (AL) (18:2 n-6) presentes em óleos vegetais (milho, soja e girassol). Também alguma quantidade de outro AGPI n-6 derivado do AL, o Ácido Araquidônico (AA) (20:4 n-6) pode ser obtida a partir de carnes (Hardman, 2004).

Para os AGPI n-3 a primeira ligação dupla é no 3° átomo de carbono a partir do carbono (n) terminal (Hardman, 2004) (Figura 6). O precursor dos ácidos graxos da família n-3 é o ácido graxo α -linolênico (ALA) (18:3 n-3), que está presente nos vegetais verdes folhosos e em diferentes quantidades nos óleos de soja (8%), canola (11%) e linhaça (57%) (Hardman, 2004; McCusker e Grant-Kels, 2010). Ácidos graxos n-3 de cadeia maior, principalmente, o ácido graxo eicosapentaenóico (EPA) (20:5 n-3) e ácido graxo docosaexaenóico (DHA) (22:6 n-3) (Figura 6), são encontrados em peixes marinhos de águas geladas como a cavala, o salmão, sardinha, arenque, dourado; truta arco íris e os seus óleos que contêm aproximadamente 60% de EPA e DHA (Hardman, 2004; McCusker e Grant-Kels, 2010).

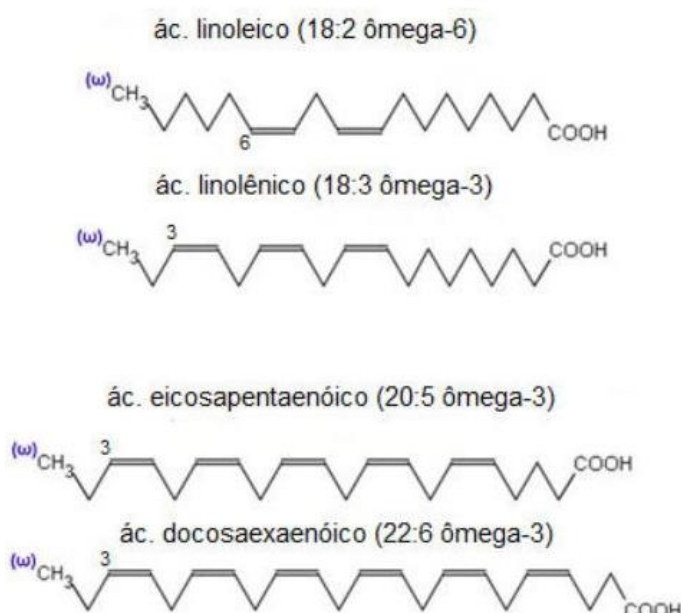


Figura 6 – Ácidos graxos essenciais

O metabolismo dos AGE n-3 e n-6 são funcionalmente distintos e apresentam importantes funções fisiológicas. Seus metabólitos quando incorporados nos fosfolípidios das membranas plasmáticas desempenham função estrutural nas células em especial naquelas altamente especializadas, como terminais sinápticos, células da retina e miócitos cardíacos (Ratnayake e Galli, 2009).

No metabolismo o ALA é convertido em dois ácidos graxos de cadeia longa ω -3: ácido graxo eicosapentaenóico (EPA) (20:5 n-3) e ácido graxo docosahexaenóico (DHA) (22:6 n-3). No entanto, o AL é convertido no organismo em ácidos graxos de cadeia longa ω -6 como o ácido aracdônico (AA) (20:4 n-6), são encontrados em carnes e entram na formação de fosfolípidios como a cardiolipina (CL) (Mahan & Escott-Stump, 2005), contribuem para manter a integridade estrutural e funcional de células e dos componentes celulares (Garrel et al, 2012).

Para que essas conversões aconteçam é necessário que o AL e o ALA sofram alongamento e dessaturações que acontecem principalmente no retículo endoplasmático das células do fígado e de leucócitos (Simopoulos, 2003; Simopoulos, 2006; Berquin, Edwards e Chen, 2008). Suscintamente, a via precisa da $\Delta 6$ e $\Delta 5$ dessaturases do sistema microssomal e um passo envolvendo a β -oxidação dos peroxissomos para ação da enzima alongase. O primeiro passo envolve a inserção de uma dupla ligação na posição $\Delta 6$ do AL e/ou ALA pela ação de $\Delta 6$ dessaturase, que é o passo limitante desta via. A seguir, ocorre o alongamento da cadeia por 2 unidades de carbono pela alongase e uma inserção de outra ligação dupla na posição $\Delta 5$ pela $\Delta 5$ dessaturase para formar AA (20:4 n-6) ou EPA (20:5 n-3) (Chilton, et al., 2008, Le et al 2014) (Figura 7).

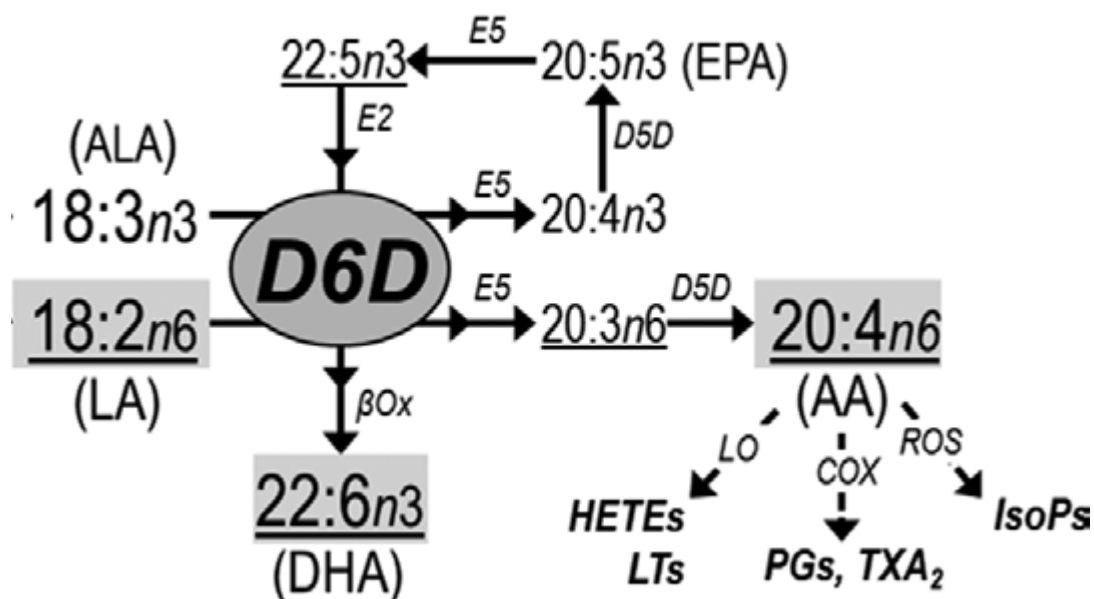


Figura 7 – Metabolismo de ácidos graxos poli-insaturados (Le et al, 2014)

O AA e EPA são precursores dos eicosanoides que estão envolvidos em diversos processos e em especial na resposta inflamatória (Chemin & Mura, 2010). Os eicosanoides derivados do AA (n-6) pela via da cicloxigenase (PGE₂, tromboxano A₂, LTB₄) são vasoconstritores, agregadores plaquetários e possuem atividades pró-inflamatórias o que poderia aumentar o risco de doenças cardiovasculares (Willett, 2007).

No entanto, o aumento da taxa de AL em humanos não está associado ao aumento da inflamação (Czernichow, Thomas e Bruckert, 2010, Levitan et al, 2012). Farvit et al, 2014, suportam uma relação inversa entre AL e doenças cardiovasculares. Na população italiana adulta, níveis plasmáticos mais elevados de AA foram associados a menores níveis de marcadores pró-inflamatórios e maiores para os anti-inflamatórios (Ferrucci et al, 2006). Em animais, estudos revelam que a administração desse ácido graxo diminui a resposta inotrópica ao isoproterenol (Hoffman et al, 1988), reduz a trombose arterial e a pressão arterial de ratos hipertensos (ten-Hoor, 1980), aumenta o fluxo coronariano (de Decker e ten-Hoor, 1979) e o inotropismo positivo (Mitchel et al, 2002) em corações isolados e diminui em 30% a frequência cardíaca nesses corações. Ribeiro Junior et al (2010) demonstraram que o tratamento de ratos com óleo de soja (composto por 54% de AL) intramuscular

por 15 dias aumentou a performance do ventrículo esquerdo sem alterar a pressão arterial. Em 2012, Lisboa Junior relata que o tratamento de ratos infartados com óleo de soja intramuscular por quinze dias preveniu a redução de contratilidade ventricular esquerda e promoveu aumento na PAS e diminuição da PDFVE, sem alterar a área de infarto e nem os parâmetros ponderais. Mulligan et al 2012, mostrou que uma dieta com PUFA n-6 atenua a disfunção contrátil do VE sem promover alteração na pressão arterial.

A ação do AL nas mitocôndrias cardíacas também tem sido descrita na literatura, no entanto, este é incapaz de entrar na mitocondria devendo sofrer oxidação. Primeiramente ele é convertido em acil-CoA para posteriormente a CoA ser substituída pela carnitina pela enzima carnitina-acil-transferase-1 formando o acil-carnitina que é transportada para a matriz mitocondria. O grupo acil é transferido de volta para a CoA, sobre o lado da matriz da membrana por ação da carnitina-acil-transferase 2.

Dentro da mitocôndria o AL ingressa a via da β -oxidação dos ácidos graxos que é responsável por 70% da energia utilizada pelo coração de mamíferos, e com a remoção, por oxidação, de sucessivas unidades de dois átomos de carbono resulta da produção de acetil CoA. Após a β -oxidação, os carbonos do grupo acetila do acetil CoA são oxidados à CO_2 , o que ocorre no ciclo do ácido cítrico. Os acetil-CoA vindos da oxidação vão entrar nessa via junto com os acetil-CoA provenientes da desidrogenação e descarboxilação do piruvato pelo complexo enzimático da piruvato desidrogenase. Nessa etapa haverá produção de NADH e FADH_2 para suprir de elétrons a cadeia respiratória da mitocôndria, que os levará ao oxigênio. Esse fluxo está acoplado a fosforilação oxidativa. Com isso a energia gerada na oxidação de ácidos graxos vai ser conservada na forma de ATP.

Após 4 semanas de tratamento com óleo de cártamo enriquecido com AL, Mulligan et al (2012), demonstram uma atenuação na redução da respiração mitocondrial no estado 3 em ratos com insuficiência cardíaca. Galvão et al (2012), relatam que após 24 semanas de uma dieta contendo 20,7% de AL (o restante era composto por ácido palmitato, palmitoleato, estearato, oleico e alfa-linoleico) os animais não apresentaram alteração na função de mitocôndria isolada quando analisaram o estado 3 e 4, e o RCR na

presença dos substratos glutamato + malato e rotenona + succinato.

Apesar dos trabalhos apresentarem resultados de dietas enriquecidas com ácido linoleico pouco se estuda o efeito do ácido linoleico em corações saudáveis e infartados. O presente estudo visa proporcionar informações sobre a ação do ácido linoleico sobre a mitocôndria e a contratilidade miocárdica após infarto agudo do miocárdio. Nossa hipótese é que o ácido linoleico administrado após o infarto do miocárdio melhora a bioenergética mitocondrial restaurando a mecânica cardíaca.

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito do ácido linoléico sobre a mecânica cardíaca e a bioenergética nas subpopulações mitocondriais cardíacas interfibrilar (IFM) e subsarcolemal (SSM) de ratos submetidos ao infarto do miocárdio (IM).

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do tratamento com AL sobre a pressão arterial, pressão sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo em ratos infartados;
- Avaliar parâmetros histológicos de corações de ratos infartados em resposta ao tratamento com AL;
- Estudar a função ventricular esquerda de corações isolados dos ratos infartados tratados ou não com AL frente a intervenções heterométricas e homeométricas;
- Avaliar o conteúdo proteicomitocondrial por grama de tecido (*Yield*) de ratos infartados com e sem AL;
- Avaliar a função e morfologia mitocondrial das duas subpopulações: subsarcolemal (SSM) e interfibrilar (IFM), através da citometria de fluxo de ratos infartados e com 15 dias de AL;
- Avaliar o efeito do AL, sobre a bioenergética mitocondrial após 15 dias da cirurgia do infarto do miocárdio;
- Investigar possíveis alterações da função da cadeia respiratória mitocondrial com a utilização de substratos específicos para os complexos I e II frente ao tratamento com AL 15 dias após o infarto;
- Avaliar a resistência mitocondrial ao cálcio (*Swelling*) de animais infartados e em resposta ao AL;
- Medir a probabilidade de abertura do poro mitocondrial em ratos após 15 dias da cirurgia do infarto do miocárdio tratados ou não com AL.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais experimentais

Foi utilizado modelo animal de ratos macho normotensos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), pesando entre 250 a 300 g com idade aproximada de 12 semanas, obtidos no Biotério da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES. Os animais foram mantidos em gaiolas, sob controle de temperatura, umidade e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e ração. O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES (CEUA – 041/2013).

Os experimentos foram divididos em dois segmentos para avaliação dos efeitos do ácido linoleico sobre a mecânica cardíaca e a bioenergética mitocondrial:

1. **Análise de diferentes concentrações de ácido linoleico:** os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, e receberam diariamente 0,1mL (i.m.) de três diferentes doses do ácido linoleico 5 mg/kg (AL5), 15 mg/kg (AL15) e 50 mg/kg (AL50) e o grupo controle (SHAM) recebeu o volume similar de 0,9% de NaCl intramuscular (i.m). A solução estoque de AL foi preparada em 100% de etanol conforme Mitchell et al, 2002. Sendo para cada grupo a seguinte diluição: AL5 – 25uL do ácido + 50uL de etanol; AL15 75 uL de ácido + 50 uL de etanol; AL50 – 250uL do ácido + 50ul de etanol; completando para 2500 uL de salina. Dados ponderais, avaliação hemodinâmica, testes funcionais de coração isolado e mitocôndria além da análise histológica foram realizados, sendo a dose de AL50 escolhida para dar continuidade ao trabalho.
2. **Efeito do ácido linoleico em animais submetidos à cirurgia de infarto do miocárdio:** 4 grupos foram estudados (Figura 8) com as mesmas análises anteriores de dados ponderais, avaliação hemodinâmica, testes funcionais de coração isolado e mitocôndria, histologia, além de microscopia eletrônica e análise bioquímica.



Figura 8 - Esquema do protocolo experimental - Os 4 grupos de animais Wistar foram alocados de acordo com o tipo de tratamento e o procedimento cirúrgico submetido (Sham ou IM). Após o procedimento cirúrgico de IM ou fictícia e a divisão dos animais em grupos, de acordo com o tipo de tratamento que receberam (salina ou ácido linoleico), todos os quatro grupos iniciaram o tratamento imediatamente e durante 15 dias.

Para realização dos protocolos experimentais três tratamentos crônicos foram realizados. Os ratos pertencentes ao primeiro tratamento (n=40) foram utilizados para aquisição dos parâmetros hemodinâmicos, dos seus pesos corporais e para realização da preparação de coração isolado e posteriormente armazenamento em solução de paraformaldeído e etanol para análise histológica.

Os ratos que pertenciam ao segundo tratamento (n=40) foram utilizados para pesagem dos ventrículos direito e esquerdo dos corações e realização do isolamento mitocondrial.

O terceiro tratamento (n=40) foi realizado para retirada de corações, onde parte foi utilizada para microscopia eletrônica e parte foi estocado a - 80° C, para utilização em mensurações bioquímicas.

3.2 Indução do infarto do miocárdio

O infarto do miocárdio foi induzido pela oclusão cirúrgica epermanente da artéria coronária descendente anterior esquerda, seguindo a técnica padrão amplamente descrita na literatura (Pfeffer et al., 1979; Mill et al., 1990; Baldo et al., 2008). O animal foi pesado e anestesiado por via intraperitoneal com mistura de quetamina (50 mg/kg, AGENER, BRASIL) e xilazina (10 mg/kg, BAYER, BRASIL). Alcançado o plano anestésico desejável, o animal teve seus membros fixados a uma mesa cirúrgica, em posição supina. Após a tricotomia

do lado esquerdo do tórax, foi realizada a assepsia do local com álcool 70% e incisão na pele do animal, seguida de dissecação dos músculos intercostais e preparação de sutura em bolsa. Era feita então incisão de cerca de 2 cm no quarto espaço intercostal esquerda para exposição do coração. Com uma linha de nylon monofilamento 6.0, a artéria coronária descendente anterior esquerda foi permanentemente ocluída, o coração reposicionado no tórax e a sutura fechada. As modificações no eletrocardiograma pelos diferentes tipos de arritmia (bloqueio átrio-ventricular, batimento prematuro, taquicardia, e fibrilação ventricular), e a recuperação dos movimentos respiratórios normais foram acompanhadas nos vinte minutos seguintes à cirurgia. Caso necessitassem, os animais recebiam assistência cardiorrespiratória. Os animais controle foram submetidos a uma cirurgia fictícia consistindo na realização de todos os passos descritos anteriormente, exceto a oclusão da artéria coronária (grupo SHAM). Após o procedimento cirúrgico, os ratos foram aleatoriamente acomodados em gaiolas com acesso a água para recuperação da anestesia.

3.3 Hemodinâmica arterial e ventricular por medida direta em animal anestesiado

Após 15 dias de tratamento, os ratos foram anestesiados via i.p. com uretana (1,2 g/Kg) e submetidos à cirurgia de cateterização da veia jugular e artéria carótida direita para mensuração dos parâmetros cardiovasculares *in vivo*. O plano anestésico foi avaliado pela ausência de responsividade ao estímulo doloroso na pata, e quando necessário, houve suplementação na dose utilizada. Após a anestesia, todos os ratos foram mantidos em manta aquecedora, com suplementação de oxigênio (0,5 L/min). A canulação da jugular direita foi realizada com um cateter de polietileno (PE 50, Clay-Adams) com extremidade curva, para facilitar a inserção no ventrículo direito (VD), e preenchido com salina heparinizada (50 UI/ml). O cateter foi acoplado a um transdutor de pressão (TSD 104A Biopac) conectado a um pré-amplificador interligado ao sistema (MP 100 Byopac Systems, Inc; CA), o qual permitiu que a pressão do VD fosse registrada e processada por um computador. Na carótida direita, por sua vez, foi inserido um cateter Millar (SPR-320) que foi

direcionado ao ventrículo esquerdo (VE) para mensurar a pressão intraventricular. Após registro, o cateter foi retraído para a carótida para registrar a pressão arterial e verificar se houve lesão de válvula aórtica. Os dados foram coletados após período de estabilização de no mínimo 10 minutos. Os seguintes parâmetros foram avaliados: Pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD); frequência cardíaca (FC); pressão sistólica e diastólica final intraventricular esquerda (PSVE e PDfVE); máximas derivadas de pressão intraventricular positiva (+dP/dt máx) e negativa (-dP/dt máx),

3.4 Avaliação do desempenho em corações isolados perfundidos pela técnica de Langendorff

Após o término do tratamento crônico, os animais receberam injeções intraperitoneais de uretana sódica (1,2 g / kg) para indução anestésica, e de heparina sódica (40 U) para evitar a formação de coágulos sanguíneos durante a manipulação dos corações. Depois de anestesiados, os ratos foram sacrificados, o tórax aberto e o coração exposto. As artérias derivadas do arco aórtico foram amarradas com fio de algodão. O coração foi retirado e perfundido retrogradamente através da aorta com solução *Krebs-Henseleit* (em mM): NaCl=120, KCl=5.4, MgCl₂=1.2, CaCl₂=1.25, NaH₂PO₄=2, Na₂SO₄=1.2, NaHCO₃=24, glicose=11; pH 7,4 e 34° C e gaseificada com mistura carbogênica (5% CO₂ e 95% O₂) através do coto aórtico com fluxo constante de 10 mL/min, de acordo com a técnica de Langendorff (Langendorff, 1898; Skrzypiec-Spring *et al.*, 2007). Um transdutor de pressão (TSD 104A- Biopac conectado a um pré-amplificador Funbec MP-100) ligado ao sistema de perfusão foi utilizado para medida e acompanhamento da pressão de perfusão coronariana (PPC). A pressão coronariana é igual ao produto da resistência coronariana pelo fluxo. Como o fluxo é mantido constante, mudanças na pressão coronariana retratam alterações na resistência da circulação coronariana. O átrio direito (AD) foi retirado visando a remoção do nódulo sinoatrial, e a frequência de estimulação elétrica foi fixada em 200 batimentos por minutos, com pulsos retangulares, com intensidade de 10 V e duração de 10 a 12 ms através de dois eletrodos (Ag/AgCl) colocados na cuba em paralelo ao coração. O átrio esquerdo foi aberto e um balão de látex inflável com água,

conectado a um transdutor de pressão (TSD 104A- Biopac conectado a um pré-amplificador Funbec MP-100) foi introduzido na cavidade ventricular esquerda para controle da pressão diastólica isovolumétrica (PD) e mensuração da pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE) e suas derivadas temporais positiva ($dP/dt +$) e negativa ($dP/dt -$). O transdutor era mantido conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems: Inc; CA) e esses registrados em computador pelo *software* Biopac Student Lab utilizando taxa de amostragem de 2000 amostras/segundo. As derivadas de pressão foram obtidas indiretamente, através das ondas de pressão isovolumétricas dos ventrículos esquerdos, após o término dos experimentos pelo mesmo *software* (filtro digital Blackman -61dB com frequência de corte de 250 Hz e taxa de amostragem de 200/s). A PD foi fixada em 5 mmHg, através da inflação do balão de látex contido na cavidade ventricular, e as preparações mantidas por um período de estabilização de 20 minutos. Após esse período foram realizadas as mensurações de PPC, PSIVE e derivadas temporais; e iniciados os protocolos experimentais em corações de ratos dos grupos Sham e AL ou Sham, AL, IM e IMAL.

3.4.1 Protocolos experimentais

3.4.1.1 Intervenção Heterométrica

Neste protocolo foi avaliada a resposta ao aumento da PD por meio de inflação do balão de látex localizado na cavidade ventricular esquerda (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mmHg). Essa manobra é conhecida como curva de função ventricular ou curva de Frank-Starling (Stefanon *et al.*, 1990).

3.4.1.2 Intervenções Homeométricas

Para a avaliação da resposta inotrópica ao cálcio, a PD do VE era mantida em 10 mmHg e a PSIVE era registrada enquanto se perfundia o coração com soluções com diferentes concentrações de cálcio (em mM): 0.62; 1.25; 1.87; 2.5 e 3.12.

Por fim, foi mensurada a resposta β -adrenérgica, realizada com a injeção *in bolus* (0.1 mL) do agonista β -adrenérgico isoproterenol (10^{-3} M). A

resposta β -adrenérgica foi medida como incremento da PSIVE após a injeção de isoproterenol. Para realização deste protocolo os corações isolados foram perfundidos com solução nutritora na qual a concentração de cálcio era 0,625 mM (Vassallo *et al.*, 1994).

3.5 Isolamento mitocondrial

Seguindo o protocolo descrito por Palmer e col., em 1977, as duas subpopulações mitocondriais (SSM e IFM) foram isoladas do ventrículo esquerdo. Os ventrículos foram lavados, fragmentados e homogeneizados (agitador mecânico e homogeneizadores – Nova técnica, Brasil e Digital Overhead Stirrer – Scilogex, USA) em 22.5 mL do tampão CP1 (Chappel-Perry: 100 mM de KCl, 50 mM de Mops, 5 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mM de EGTA, 1 mM de ATP, com pH 7.4 a 4 °C). Em seguida, o homogeneizado foi submetido à primeira centrifugação (Centrifuge 5804 R – Eppendorf, Germany) a 580 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante desta primeira centrifugação foi filtrado com auxílio de uma gaze e transferido para um tubo etiquetado SSM. O *pellet* desta primeira centrifugação foi suspenso em 7.5 mL do mesmo tampão (CP1) e novamente centrifugado a 580 x g por 10 min. O sobrenadante desta segunda centrifugação foi filtrado com auxílio de uma gaze e transferido ao "tubo SSM" contendo o primeiro sobrenadante. Em seguida, este tubo foi novamente centrifugado a 580 x g por 7 min. O *pellet* remanescente a essa centrifugação corresponde à subpopulação SSM. O *pellet* remanescente da segunda centrifugação foi suspenso em 9 mL de tampão Chappel-Perry e adicionou-se 5 mg de tripsina por grama de tecido dissolvido em 1 mL do mesmo tampão. Após a adição de tripsina, foi feita uma segunda homogeneização e as amostras foram agitadas com o auxílio de um agitador magnético (ika® c-mag hs10, USA) em banho de gelo por 10 min. Após agitação, foram adicionados 10 mL de tampão Chappel-Perry contendo albumina bovina (fraction V fatty acid free) 2 mg/mL e as amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 7.500 x g por 10 min a 4 °C. O *pellet* foi novamente suspenso em 7.5 mL do tampão Chappel-Perry e centrifugado a 580 x g por 7 min a 4 °C. O sobrenadante desta última centrifugação foi filtrado com auxílio de gaze e novamente centrifugado a 3.000 x g por 7 min. O *pellet* final corresponde a

subpopulação interfibrilar (IFM). Os pellets correspondentes a subpopulação SSM e IFM foram lavados duas vezes em tampão KME (contendo 100 mM de KCl, 50 mM de Mops e 0,01 M de EGTA) e novamente centrifugados a 3.000 x g por 7 min. Os *pellets* foram suspensos em 200 μ L de tampão KME e a concentração proteica foi determinada pelo método de Lowry.

3.5.1 Análise funcional da cadeia respiratória mitocondrial – oxidação fosforilativa

A análise funcional dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial foi avaliada com o auxílio de um transdutor para medida de oxigênio (Clark electrode, Qubit system, Canada) de acordo com Palmer e cols. (1977). Amostras das mitocôndrias (250 μ g de proteína) foram incubadas, em um tampão para respiração mitocondrial (100 mM de KCl, 50 mM de MOPS, 5 mM de KH_2PO_4 , 1 mM de EGTA e 1 mg/mL de BSA/Fraction V, com pH 7.4). O estado III significa a velocidade de consumo de oxigênio quando a mitocôndria é colocada em um meio com substrato oxidável com ADP, produzindo assim o ATP. O estado IV que é a velocidade do consumo de O_2 após a mitocôndria já ter consumido todo o ADP disponível, foram medidos com adição dos substratos glutamato + malato (10 e 5 mM, respectivamente), piruvato + malato (10 e 5 mM, respectivamente), palmitoil + carnitina (40 μ M) e rotenona + succinato (7.5 μ M e 20 mM, respectivamente). Após a adição dos substratos, foi adicionado ADP para atingir uma concentração final de 200 μ M e observou-se um aumento do consumo de oxigênio em função do tempo. Após completa depleção do ADP, observado pelo surgimento do estado IV, adicionou-se oligomicina, inibidor do complexo V (fração F₀) da cadeia respiratória. O RCR que é a razão do estado III / estado IV verifica o acoplamento da cadeia respiratória e o ADP:O que é a razão do Pi/O_2 é o indicativo de quanto de O_2 é reduzido em H_2O na fosforilação oxidativa indicando sua eficiência. Os estados III, IV e o RCR foram calculados posteriormente (figura 9).

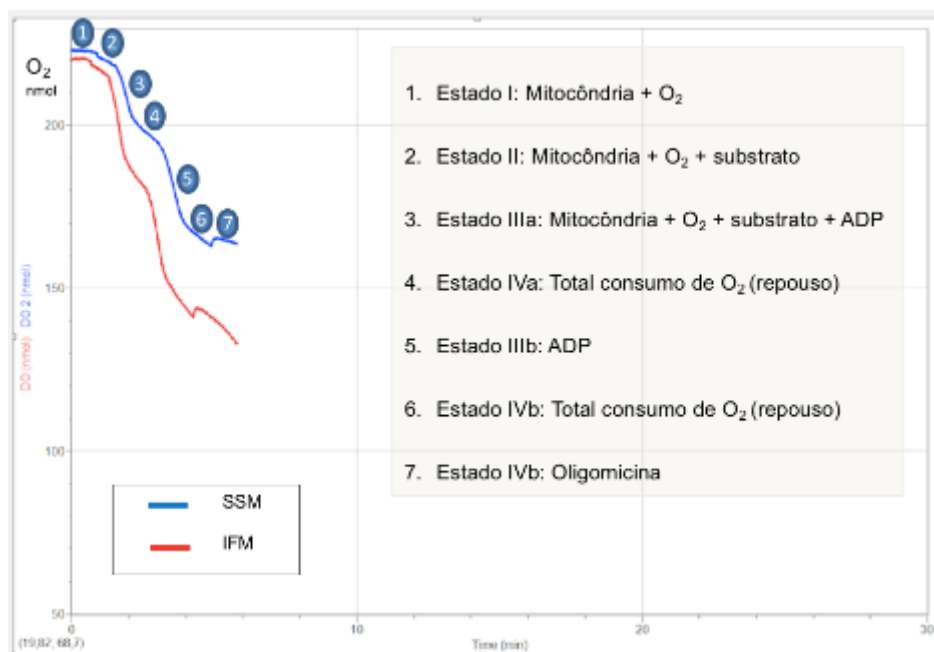


Figura 9 - Esquema ilustrativo da mensuração da respiração mitocondrial (estado I a IV e a razão estado III / estado IV) pelo consumo de oxigênio (O_2).

3.5.2 Medidas indireta do potencial de membrana e tamanho da mitocôndria

A medida do potencial de membrana foi feita, de maneira indireta, utilizando citometria de fluxo (Facsan, Becton Dickinson, USA) como descrito por Dabkowski et al, (2009). Amostras das subpopulações (SSM e IFM) foram incubadas em tampão KME (contendo 100 mM de KCl, 50 mM de Mops e 0,01 M de EGTA) com um marcador para potencial de membrana da mitocôndria [5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol carbocyanine iodide (300 nM JC-1; Invitrogen)] ou MitoTracker 26 Deep Red 633 por 15 min a 37 °C. Estes marcadores se difundem pela membrana intacta da mitocôndria e são seletivos, porque dependem do potencial para emitir fluorescência vermelha (~ 590 nm). Quando se tem emissão de fluorescência verde (~ 525 nm) corresponde a queda do potencial de membrana. Cada parâmetro foi detectado usando um laser específico e 100.000 eventos foram medidos por amostra fresca. Os resultados foram expressos como a razão da fluorescência vermelha pela verde. Para as medidas de tamanho, o aparelho era calibrado com microesferas (Invitrogen) que permitiam medir exatamente o tamanho da mitocôndria. Os dados foram expressos em unidades arbitrárias.

3.5.3 Captação do cálcio e probabilidade de abertura do poro mitocondrial

A probabilidade de abertura do poro mitocondrial nas subpopulações foi estimada por meio de aparelho (SynergyTM 2 Multi-Mode Microplate Reader, BioTek, USA) em ambas as subpopulações. Foram incubados 25 µg de proteína em 200 µL de tampão livre de cálcio (100 mM de KCl, 50 mM de MOPS, 5 mM de KH₂PO₄, 5 mM de EGTA, 1 mM de MgCl₂, 5 mM de glutamato, e 5 mM de malato à 37 °C) em um fluorímetro com monitoramento constante da fluorescência. Em seguida, foi adicionado um marcador de cálcio (calcium green-5N, Invitrogen) com excitação e emissão de 488 e 530 λ, respectivamente. Após a adição do marcador para cálcio, foi adicionado 32 doses de cálcio (5 µL) a cada 7 min.

3.5.4 Resistência ao cálcio (*Swelling*)

O teste de tolerância ao cálcio foi realizado como descrito na literatura. As duas subpopulações mitocondriais, foram suavemente homogeneizadas em solução tampão livre de cálcio (100 mM de KCl, 50 mM de MOPS, 5 mM de KH₂PO₄, 5 mM de EGTA, 1 mM de MgCl₂, 5 mM de glutamato, e 5 mM de malato, em pH 7.4) com concentração final de 2 mg/mL de proteína em uma placa de 96 poços. Em seguida, a placa foi inserida em um leitor de placas (Elx808 Biotek, USA) e aquecida a 37 °C. Após atingir 37 °C, foi feita uma leitura de absorbância a 540 nm por 2 min a fim de se obter valores basais de absorbância. Após essa leitura, foi adicionado cloreto de cálcio na concentração final de 100 e 500 nM por µg de proteína mitocondrial e nova leitura foi realizada por 20 min.

3.6 Determinação da hipertrofia cardíaca e extensão do infarto

Para caracterização do modelo do infarto do miocárdio os átrios foram removidos dos ventrículos, e esses dissecados, separados e pesados. O septo interventricular foi considerado parte do VE. A hipertrofia cardíaca foi avaliada utilizando pesos úmidos do VD e VE corrigidos pelo PC do respectivo animal. Os contornos do VE e área de cicatriz (AC) do coração foram cuidadosamente

separados e delineados sobre papel milimetrado, sendo as áreas medidas por contagem de pontos, para obtenção da área correspondente em mm² (Mill et. al, 1990). O resultado da medida do infarto é descrito aqui como a área percentual infartada do VE em relação a área total do VE. Como a extensão do infarto é um fator importante para o remodelamento cardíaco, apenas animais com pelo menos 30% de área de infarto foram incluídos neste trabalho. Adicionalmente, os pulmões tiveram seus pesos avaliados.

3.6.1 Análises histológicas

Para análise de colágeno e da secção transversa foram feitas análises histológicas. Os corações permaneceram 24 horas em solução de paraformaldeído e em seguida em etanol 70%. Todos os corações foram cortados em 3 secções transversas: ápice, anel mediano (aproximadamente 3 mm) e base. Somente o anel mediano foi utilizado para as análises.

3.6.1.1 Preparação do material

Após o corte, a superfície distal do anel mediano do coração foi identificado e posicionado em cassete histológico (Easy Path) de forma que o corte iniciasse dessa região após inclusão do tecido em parafina histológica (EasyPath). Para tal, utilizou-se um processador automático de tecidos (Lupetec Modelo PT 05) e a imersão do material foi feita automaticamente seguindo as etapas descritas abaixo:

- a) Imersão em etanol 70% por 30 minutos, seguido de;
- b) Etanol 80% por 30 minutos;
- c) Etanol 100% por 30 minutos;
- d) Xilol + etanol (1:1) por 30 minutos;
- e) Xilol por 30 minutos;
- f) Xilol + parafina (1:1) por 30 minutos;
- g) Parafina histológica a 60°C por 60 minutos;
- h) Parafina a 60°C rapidamente;
- i) Inclusão em parafina a 60°C em formas especiais e secagem. Para essa

etapa utilizou-se um dispensador de parafina e uma placa refrigerada (Lupetec).

3.6.1.2 Seleção dos cortes

Na microtomia, foram feitos cortes transversais de 7 µm de espessura, iniciando pela superfície apical do anel mediano do miócito. Uma média de 3 secções foram obtidos e montados em lâminas de vidro para coloração.

3.6.1.3 Quantificação do colágeno Intersticial

O corante *Picrosirius red*, promove uma coloração avermelhada na área de colágeno e amarelada no resto do tecido, constituindo um método histoquímico específico para quantificação do colágeno intersticial. O protocolo de coloração está descrito a seguir:

- a) Xilol I: 5 minutos;
- b) Xilol II: 5 minutos;
- c) Xilol III: 5 minutos;
- d) 50% Álcool Etílico (95%) – 50% Xilol: 5 minutos;
- e) Álcool Etílico (95%) I: 5 minutos;
- f) Álcool Etílico (95%) II: 5 minutos;
- g) Álcool Etílico (95%) III: 5 minutos;
- h) Água corrente: 10 minutos;
- i) Corante Picrosirius: 1 hora;
- j) Água corrente: 10 minutos;
- k) Álcool Etílico (95%) I: 5 minutos;
- l) Álcool Etílico (95%) II: 5 minutos;
- m) Álcool Etílico (95%) III: 5 minutos;
- n) 50% Álcool Etílico (95%) – 50% Xilol: 5 minutos;
- o) Xilol I: 5 minutos;
- p) Xilol II: 5 minutos;
- q) Xilol III: 5 minutos.

3.6.1.4 Análise da área de secção transversa

Para análise da área de secção transversa foi realizada a coloração com Hematoxilina e Eosina. Os cortes foram corados inicialmente com Hematoxilina para identificação do núcleo na cor azul arroxeado, em seguida, pela Eosina para marcar em rosa o citoplasma. O protocolo está descrito abaixo:

- a) Xilol I: 5 minutos;
- b) Xilol II: 5 minutos;
- c) Xilol III: 5 minutos;
- d) 50% Álcool Etílico (95%) – 50% Xilol P.A.: 5 minutos;
- e) Álcool Etílico (95%) I: 5 minutos;
- f) Álcool Etílico (95%) II: 5 minutos;
- g) Álcool Etílico (95%) III: 5 minutos;
- h) Água corrente: 10 minutos;
- i) Hematoxilina de Mayer: 15 minutos;
- j) Água corrente: 10 minutos;
- k) Eosina: 2 minutos;
- l) Álcool Etílico (95%) I: 5 minutos;
- m) Álcool Etílico (95%) II: 5 minutos;
- n) Álcool Etílico (95%) III: 5 minutos;
- o) 50% Álcool Etílico (95%) – 50% Xilol P.A.: 5 minutos;
- p) Xilol I: 5 minutos;
- q) Xilol II: 5 minutos;
- r) Xilol III: 5 minutos.

Para análise as lâminas coradas foram fotografadas com uma câmera acoplada a um microscópio ótico (BEL, Engineering, Top Light B2, Itália) sob aumento de 400 vezes.

A área de secção transversa, determinada por pelo menos 100 miócitos por lâmina, foi utilizada como indicador do tamanho da célula. Os diâmetros maiores e menores foram mensurados para determinar o volume nuclear.

Cinquenta núcleos de cada animal foram avaliados através da fórmula: $V = \pi AB^2/6$; onde A é o maior diâmetro e B o menor diâmetro (Oliveira Junior et al, 2013)

3.7 Estudo da expressão proteica pela técnica de western blot

A técnica de Western Blot foi utilizada para determinar a influência do ácido linoleico e do infarto do miocárdio na expressão protéica da SERCA-2a, PLB, PGC1 α , NRF e PPAR α de tiras isoladas do VE de ratos dos grupos SHAM, AL, IM e IMAL. Além da expressão do Canal Uniporter, OXPHOS e Ciclofilina D em mitocôndria isolada.

Os tecidos (VE e mitocôndria) foram mantidos a -80 °C até o momento em que foram utilizados. Com auxílio do homogeneizador (Marconi, MA102/MINI, Brasil), as amostras de VE foram homogeneizadas em microtubos contendo solução de Tris HCl 50 mM, NaCl 0,9 M, pH:7,4, em banho de gelo. Depois de homogeneizadas as amostras foram centrifugadas (Eppendorf-Neitheier- Hinz GmbH 22331, Alemanha) durante 20 minutos, 11.000 rpm a 4°C e, em seguida, o sobrenadante era coletado. Em pequena amostra do sobrenadante era realizada a quantificação protéica segundo método de Lowrie. Posteriormente, foi calculado o volume necessário para carga de 25 - 80 μ g de proteína, sendo este volume de amostra misturada, em partes iguais, com tampão de homogeneização. Alíquotas do homogeneizados foram diluídas em solução de Laemmli 2X (0,5 mM de uréia, 0,17 mM de SDS, 39 μ M de ditiodiol, 0,01 M de Tris e azul de bromofenol 0,5 %). As amostras foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 10 % previamente imersos em solução tampão para eletroforese (25 mM de Tris HCl, 190 mM de glicina e 0,1 % de SDS) e submetidas a corrente constante de 60 V por aproximadamente 3 horas (PowerPac™ HC, BioRad, Singapura) a 8° C. Após o término da eletroforese, foi feita a transferência elétrica das proteínas para a membrana de Nitrocelulose (Amersham, UK) previamente ativada por água durante 20 segundos. Para a transferência, foi realizado o método de transferência líquida no qual o gel, a membrana e o papel Whatman foram montados no sistema de sanduíche em suporte “Holder Cassete” e acoplados à uma cuba (Trans-Blot SD Cell Bio-Rad, USA) contendo solução tampão de

transferência (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1 % e metanol 20 %) à 4° C com uma corrente de 0,25 A por 20 horas. Ao final da transferência, as membranas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com solução de bloqueio (leite desnatado 5%, Tris HCl 20mM, NaCl 100 mM e Tween 20 à 0,1 %, pH 7,5) para evitar a união não-específica com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas foram incubadas durante toda a noite à 4 °C, sob agitação, em solução com tampão TBS-T (Tris HCl 10 mM, NaCl 100 mM e Tween 20 à 0,1 %, pH 7,5) adicionados aos anticorpos primários para SERCA-2a ([1:1000], Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), PLB ([1:1000] Thermo Scientific, IL, EUA), , PGC-1 α (H-300) ([1:500] Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), NRF-1 (H-300) ([1:500] Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), PPAR α ([1:250] Cell Signaling, EUA), MCU ([1:1000] Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), OXPHOS ([1:2500] Abcam, Cambridge, MA, EUA), Ciclofilina D ([1:1000] Abcam, Cambridge, MA, EUA) e anti-gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) ([1:5000], Cell Signaling, EUA). Depois disto, as membranas eram lavadas, sob agitação, com solução TBS-T durante 30 minutos para remoção do excesso do anticorpo primário, sendo trocada a solução de TBS-T a cada 5 minutos. Posteriormente as membranas foram incubadas durante 1 hora com anticorpo secundário, Imunoglobulina IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase (1:5000, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) ou IgG anti-coelho conjugado com peroxidase (1:5000, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) ou IgG anti-cabra conjugado com peroxidase (1:5000, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

A proteína foi detectada por uma reação de quimiluminescência, utilizando um sistema de detecção (ECL,ThermoScientific) incubando as membranas por 5 minutos. A reação foi captada pelo ChemidocTM Image System e quantificada pelo software Bio-rad Image Lab 5.2.1. As bandas das proteínas foram quantificadas mediante análise densitométrica arbitrárias, utilizando o Programa Image J. Para a relativa expressão da SERCA-2a, PLB, PGC1- α , NRF-1 e PPAR α , seus valores foram divididos pelos valores correspondentes de GAPDH. Já para proteínas mitocondriais MCU, CYP e OXPHOS a coloração *Ponceau* foi utilizado como fator de correção.

3.8 Expressão dos resultados e análise estatística

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Os valores de “n” representam o número de animais utilizados em cada protocolo experimental. A análise estatística dos resultados foi realizada por análise de variância (ANOVA), duas vias, medidas repetidas ou completamente randomizada. Quando a ANOVA apresentava significância estatística o teste post-hoc de Fisher era realizado. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$. Os resultados da expressão protéica foram apresentados como relação entre a densidade óptica destas proteínas em relação ao GAPDH ou *Ponceau*.

3.9 Fármacos e reagentes utilizados

- Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) (Plusone)
- Ácido Etilenoglicoltetracético (Sigma)
- Adenosina 5'-difosfato (ADP), (Sigma)
- Adenosina 5'-trifosfato (ATP), (Sigma)
- Albumina bovina Fraction V (Sigma)
- Anticorpo para detectar Canal Uniporter
- Anticorpo para detectar Ciclofilina D
- Anticorpo para detectar fosfolambam (Thermo Scientific)
- Anticorpo para detectar GAPDH (Cell Signaling)
- Anticorpo para detectar NRF-1 (Santa Cruz)
- Anticorpo para detectar os Complexos da Cadeia Respiratória
- Anticorpo para detectar PGC1 α (Santa Cruz)
- Anticorpo para detectar PPAR α
- Anticorpo para detectar SERCA-2a (Santa Cruz)
- Cálcio green
- Carbonato de sódio (Sigma)
- Cloreto de cálcio (Sigma)

- Cloreto de magnésio (Sigma)
- Cloreto de potássio – KCl (Sigma)
- Cloreto de sódio – NaCl (Sigma)
- Dihidrogenofosfato de potássio (Sigma)
- Etanol absoluto (Sigma)
- Fosfato de potássio (Sigma)
- Fosfato de sódio Monobásico - NaH_2PO_4 (Merck)
- Glutamato (Sigma)
- Heparina Sódica (Roche)
- Hidróxido de potássio (Sigma)
- Malato (Sigma)
- Metanol (Sigma)
- MOPS - 3 - (N-morfolino) Ácido propano sulfônico
- Oligomicina
- Palmitoil + carnitina
- Piruvato
- Reagente Folin & Ciocalteu's phenol (Sigma)
- Reagente para detecção de Western Blot (ECL) (Thermo Scientific)
- Rotenona (Sigma)
- Succinato (Sigma)
- Sulfato de cobre 2% (Sigma)
- Sulfato de magnésio
- Tartarato
- Tripsina de Pâncreas Bovina (Sigma)

4. RESULTADOS

Para melhor apresentação no texto e compreensão do leitor, os resultados serão separados em duas seções de acordo com a etapa do projeto. Na primeira seção, serão apresentados os dados dos grupos submetidos às três diferentes concentrações de AL referentes à mecânica cardíaca e função mitocondrial. Em seguida, será apresentado o efeito do ácido linoleico na mecânica e na função mitocondrial cardíaca em modelo animal de disfunção cardíaca após infarto do miocárdio.

4.1 Análise de parâmetros ponderais após 15 dias de tratamento com diferentes doses de AL

Com o objetivo de avaliar o ganho de peso corporal dos ratos dos grupos Sham e tratados com AL foi realizada a pesagem desses animais no início do tratamento e ao final de 15 dias do protocolo experimental. Como apresentado na Tabela 1, no início do tratamento, os ratos apresentavam peso corporal similar. O tratamento com AL ou salina não interferiu no ganho de peso corporal destes animais. Não houve diferença significativa entre os pesos de ambos os ventrículos quando comparados aos dos ratos Sham, AL5, AL15 e AL50. As razões entre os pesos dos ventrículos, o peso do fígado e dos pulmões pelo peso corporal foram similares para todos os grupos. A análise histológica do coração confirmou que o tratamento com AL não alterou o tamanho, volume nuclear nem aumentou o colágeno intersticial dos cardiomiócitos (figura 10).

Tabela 1 Parâmetros ponderais após 15 dias

	Sham	AL5	AL15	AL50
PC inicial, g	282,7 ± 9,8	264,6 ± 2,6	259,6 ± 8,7	265,0 ± 4,2
PC final, g	341,2 ± 13,9	337,5 ± 5,2	336,5 ± 9,5	335,7 ± 9,2
VE, mg	0,904 ± 0,042	0,932 ± 0,006	0,899 ± 0,048	1,008 ± 0,091
VD, mg	0,150 ± 0,009	0,181 ± 0,006	0,160 ± 0,002	0,184 ± 0,015
VE/PC, mg/g	2,59 ± 0,04	2,73 ± 0,09	2,57 ± 0,07	2,71 ± 0,075
VD/PC, mg/g	0,45 ± 0,02	0,61 ± 0,028	0,50 ± 0,036	0,53 ± 0,03
PP/PC, mg/g	4,85 ± 0,23	4,34 ± 0,22	4,19 ± 0,18	5,84 ± 0,70
PF/PC, mg/g	40,71 ± 2,47	41,52 ± 2,50	37,21 ± 0,79	39,58 ± 0,60

Peso corporal inicial (PC inicial); Peso corporal final (PC final); Peso ventricular esquerdo (VE); Relação peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal (VE/PC); Peso ventricular direito (VD); Relação peso do ventrículo direito pelo peso corporal (VD/PC), Relação peso dos pulmões pelo peso corporal (PP/PC) e Relação peso do fígado pelo peso corporal (PF/PC) de animais Sham e tratados com 5 (AL5), 15 (AL15) e 50mg/Kg (AL 50) de ácido linoleico. Os resultados estão expressos como média ± EPM. ANOVA uma via seguida de pos-hoc de Fisher. Número de animais entre 7 e 9 por grupo.

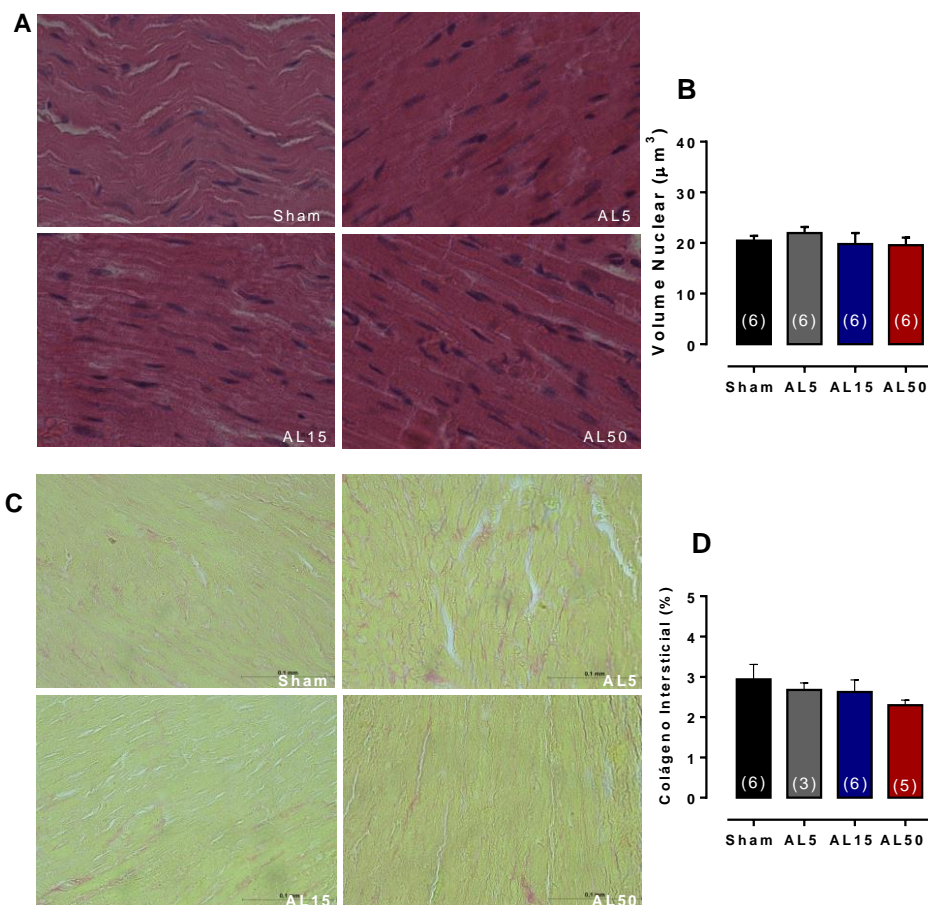


Figura 10 - Análise histológica do ventrículo esquerdo de grupos tratados com diferentes concentrações de ácido linoleico (AL) por 15 dias. Secções coradas com hematoxilina e eosina representativas dos quatro grupos experimentais (A), expressão do volume nuclear em μm^3 (B), e coloração de Picrosirius (C) e mensuração da porcentagem de colágeno intersticial (D). Aumento original $\times 1000$. Os dados são expressos como média \pm EPM. O número de animais é indicado entre parênteses.

4.2 Parâmetros hemodinâmicos

Após 15 dias de administração de ácido linoleico ou solução salina, os ratos foram anestesiados e os parâmetros hemodinâmicos arterial e intraventricular esquerdo foram mensurados de forma direta por meio de cateterização da artéria carótida (Tabela 2). Não houve diferença nas FC, PAD e PAS, entre os grupos tratados com salina e AL. Não houve diferença nos valores de PSVE, PDfVE, $dP/dt + VE$ e $dP/dt - VE$ entre os grupos.

Tabela 2 Parâmetros hemodinâmicos após 15 dias

	Sham	AL5	AL15	AL50
FC, bpm	334 ± 13	301 ± 3	311 ± 7	323 ± 7
PAS, mmHg	102,1 ± 2,1	90,9 ± 3,3	101,6 ± 2,9	104,1 ± 4,5
PAD, mmHg	64,3 ± 2,6	56,8 ± 3	65,8 ± 3	71,5 ± 5,8
PSVE, mmHg	107,7 ± 1,8	102,4 ± 5,1	105,5 ± 2,7	107,4 ± 4,5
PDfVE, mmHg	2,21 ± 0,66	1,22 ± 0,14	1,03 ± 0,15	1,91 ± 0,91
+dP/dt VE, mmHg/s	6921 ± 613	5616 ± 476	6273 ± 286	6177 ± 544
-dP/dt VE, mmHg/s	- 6202 ± 283	- 5836 ± 487	- 5968 ± 202	- 6161 ± 397

Frequência cardíaca (FC); pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD); pressão sistólica de ventrículo esquerdo (PSVE); pressão diastólica final de ventrículo esquerdo (PDfVE); derivada positiva (+dP/dt) e negativa (-dP/dt) desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (VE) de animais Sham e tratados com 5 (AL5), 15 (AL15) e 50 mg/Kg (AL 50) de ácido linoleico. Os resultados estão expressos como média ± EPM. ANOVA uma via seguida de pos-hoc de Fisher. Número de animais entre 7 e 9 por grupo.

4.3 Avaliação dos parâmetros cardíacos em corações isolados

Utilizamos o método de perfusão do coração isolado através da técnica de Langendorff para avaliar a resposta inotrópica ventricular esquerda de ratos dos grupos AL5, AL15, AL50 em relação ao Sham. A Figura 11A mostra que a administração de ácido linoleico melhora o desempenho cardíaco, por exemplo, na PD de 10 mmHg houve aumento da PSIVE em aproximadamente 30% no grupo AL15 e 66% no grupo AL50, respectivamente. As derivadas temporais também sofreram alterações significativas. A dP/dt máx e min aumentaram respectivamente 66 e 17 %, em relação ao Sham no grupo AL50 (Figura 11B-C, $p < 0,05$).

4.3.1 Intervenção Heterométrica

Por meio da inflação do balão de látex inserido no interior da cavidade ventricular esquerda era possível incrementar a PD. Como esperado, o aumento da PD promove aumento da PSIVE entre os grupos, porém, a PSIVE dP/dt máx e min foram maiores no grupo AL50 comparados ao grupo Sham (figura 11).

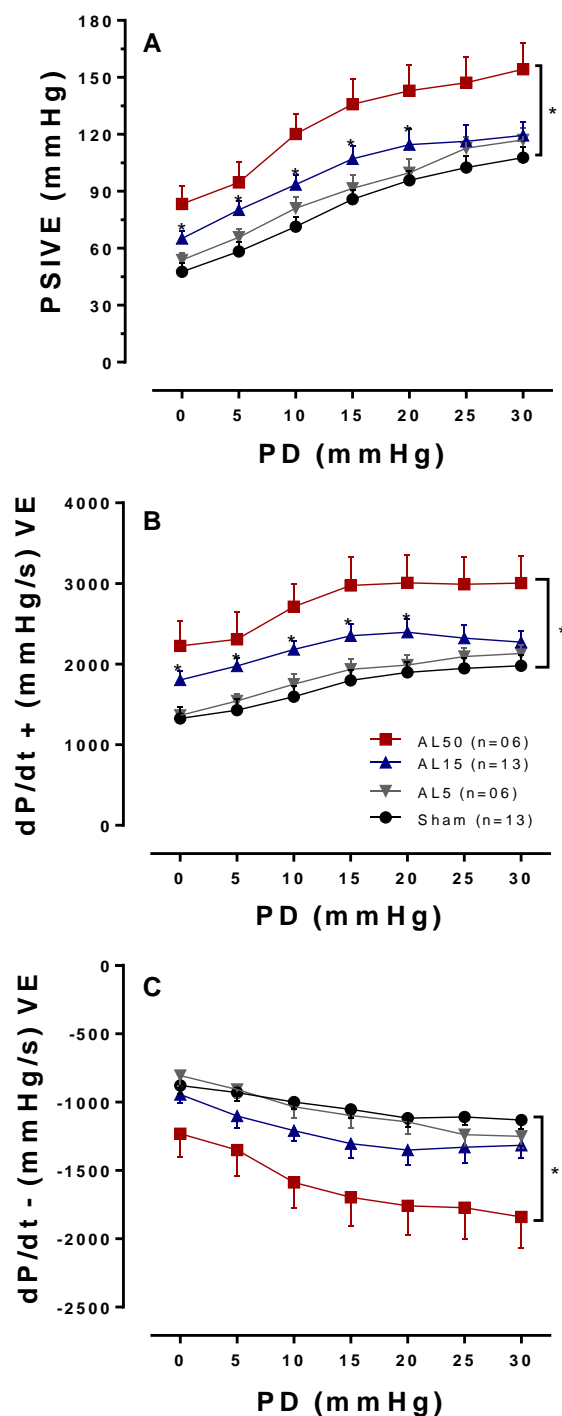


Figura 11 - Pressão sistólica isovolumétrica e derivadas temporais de corações isolados de ratos dos grupos Sham, AL5, AL15 e AL50 em diferentes pressões diastólicas. (A)- Pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE); (B) - Derivada de pressão em função do tempo positiva (dP/dt +); (C) - Derivada de pressão em função do tempo negativa (dP/dt -). Pressão Diastólica (PD). Os dados foram expressos como Média \pm EPM. ANOVA uma via seguida de *post hoc* de Fisher. * $p < 0,05$ vs Sham. Número de animais é indicado entre parênteses.

4.3.2 Intervenção Homeométrica: avaliação da resposta ao cálcio

A Figura 12 demonstra que o tratamento com ácido linoleico 50 mg/Kg promoveu o aumento da PSIVE e das dP/dt positiva e negativa, em resposta a elevação das concentrações de cálcio na solução de perfusão,.

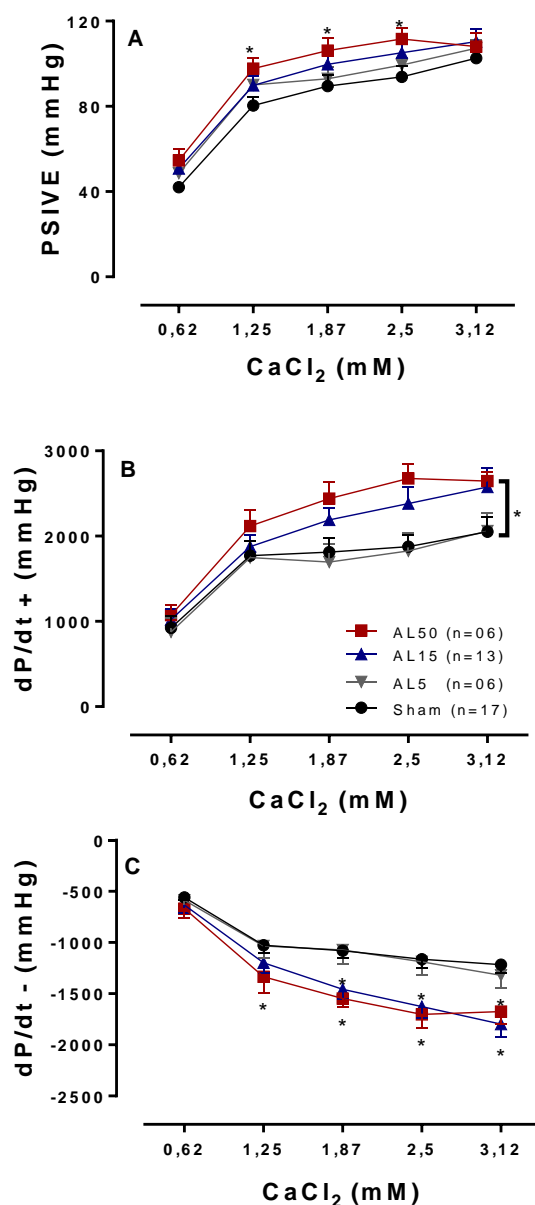


Figura 12 - Pressão sistólica isovolumétrica e derivadas temporais de corações isolados de ratos dos grupos Sham, AL5, AL15 e AL50 em diferentes concentrações de cálcio. (A)- Pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE); (B)- Derivada positiva de pressão em função tempo ($dP/dt +$); (C)- Derivada negativa de pressão em função do tempo ($dP/dt -$). Os dados estão expressos como Média \pm EPM. ANOVA uma via seguida de *post hoc* de Fisher. * $p < 0,05$ vs Sham. O número de animais é indicado entre parênteses.

4.3.3 Intervenção Homeométrica: resposta β -adrenérgica

Os resultados mostram que o isoproterenol induziu resposta inotrópica positiva, entretanto, não houve diferença entre os grupos (Figura 13).

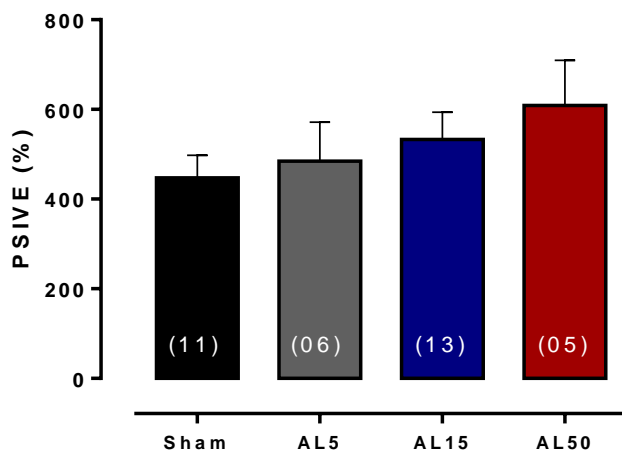


Figure 13 - Resposta inotrópica positiva à estimulação β -adrenérgica (isoproterenol 10^{-3} M) em corações isolados de ratos dos grupos Sham, AL5, AL15 e AL50. Aumento percentual da pressão sistólica isovolumétrica do Ventrículo esquerdo (PSIVE %). Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA uma via seguida de *post hoc* de Fisher. O número de animais é indicado entre parênteses.

4.4 Caracterização da função mitocondrial cardíaca de ratos tratados com ácido linoleico

4.4.1 Yield mitocondrial

O *Yield*, rendimento mitocondrial, é a quantidade de proteína mitocondrial por grama de tecido. Não houve diferença no rendimento proteico da subpopulação IFM entre os grupos estudados (Sham AL5, AL15, AL50) como mostrado na Figura 14A. Entretanto, para a subpopulação subsarcolemal (SSM), o grupo AL50 apresentou diferença significativamente maior em comparação com o grupo Sham, porém, no grupo AL15 o rendimento proteico foi menor em relação ao Sham (Figura 14B).

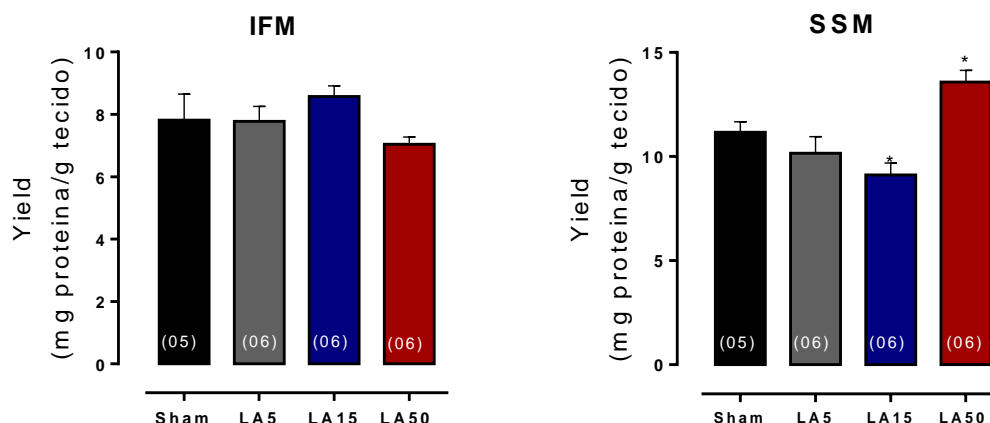


Figura 14 - Yield mitocondrial nas subpopulações interfibrilar (IFM) subsarcolemal (SSM) do ventrículo esquerdo dos grupos Sham, AL5, AL15 e AL50. Os dados estão expressos como Média \pm EPM. ANOVA uma via seguida de *post hoc* de Fisher. * $p < 0,05$ vs Sham. O número de animais é indicado entre parênteses.

4.4.2 Respiração mitocondrial

Os efeitos das diferentes doses do ácido linoleico na bioenergética das subpopulações mitocondriais nos grupos estudados, foram avaliados através da medida do consumo de O₂ mitocondrial por meio da respiração máxima no Estado 3 (sob a estimulação de ADP) e Estado 4, e do controle respiratório, que compreende a razão do Estado 3 pelo Estado 4. Vale destacar que todos os ensaios foram feitos na presença de succinato, malato e glutamato, substratos que conhecidamente participam das funções respiratórias fisiológicas no tecido cardíaco, além de piruvato, palmitoil + carnitina e da rotenona. Estes substratos utilizam vias oxidativas distintas, transporte mitocondrial e fornecem elétrons via NADH⁺ para o Complexo I e o complexo II forma FADH₂ que doa elétrons para Ubiquinona.

4.4.2.1 Avaliação do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial: substrato glutamato + malato

A taxa máxima de respiração mitocondrial (Estado 3) foi expressa em termos de nanoátomos de oxigênio por mg de proteína mitocondrial por minuto. A avaliação da subpopulação IFM, utilizando glutamato + malato como

substratos, foi maior em todos os grupos que receberam ácido linoleico comparado com o grupo Sham (Figura 15A). O estado 3 na subpopulação SSM não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados (Figura 15B). O ácido linoleico também não foi capaz de alterar a velocidade do consumo de O_2 após a mitocôndria já ter consumido todo o ADP disponível (Estado 4) em nenhuma das duas subpopulações (Figura 15 C, D). A quantidade de ADP (200 μ M) adicionado na câmara para a quantidade total de oxigênio consumido no estado 3 foi encontrado aumentada na subpopulação IFM e aumento apenas no grupo AL5 SSM (Figura 15 E, F).

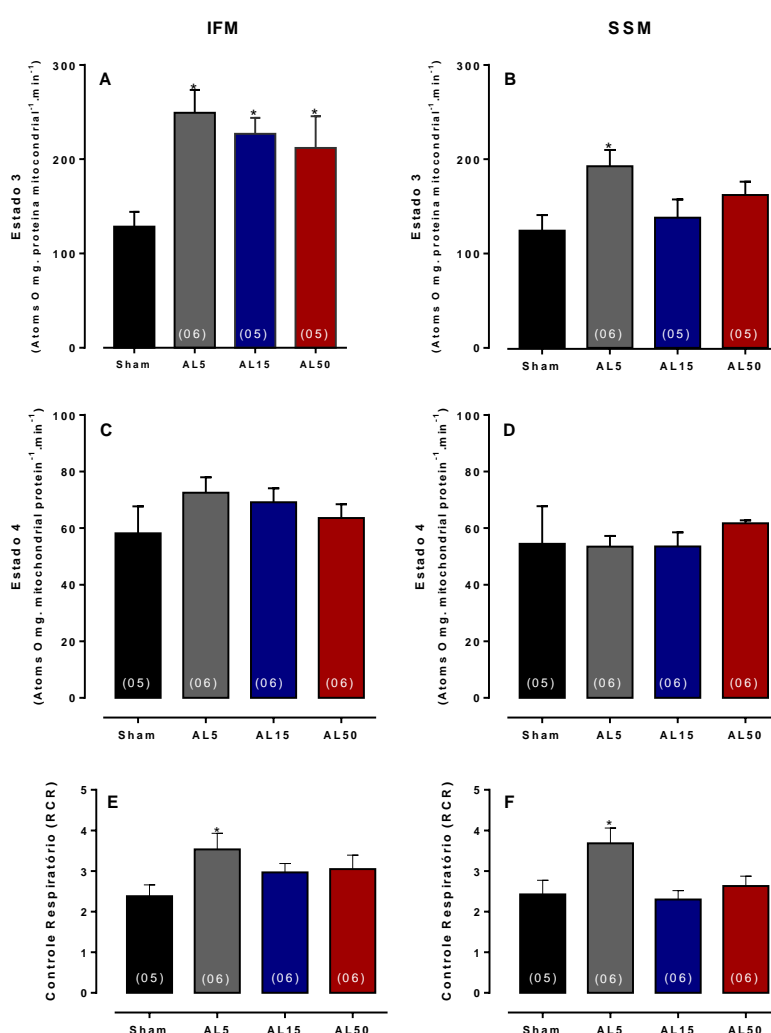


Figura 15 - Teste com glutamato + malato como substrato para avaliação do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial da fração IFM e SSM de ratos Sham, AL5, AL15 e AL50 por 15 dias em A-B: Estado 3; C-D: Estado 4; E-F: Controle respiratório (RCR). Os valores estão expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. ANOVA uma via seguida de *post hoc* de Fisher. * $p < 0,05$ vs Sham. O número de animais é indicado entre parênteses.

4.4.2.2 Teste com os demais substratos para avaliação da cadeia respiratória mitocondrial das subpopulações interfibrilar e subsarcolemal

Quando utilizamos o piruvato + malato como substrato a fim de avaliar o Complexo I, o estado 3 foi encontrado aumentado apenas no grupo AL15 na subpopulação SSM comparado com o grupo Sham. Além disso, o estado 4 e RCR foram semelhantes entre os grupos estudados (Sham, AL5, AL15 e AL50) conforme Tabela 3.

Utilizou-se o palmitoil + carnitina para analisar a β -oxidação, que reflete o transporte mitocondrial de palmitoil + carnitina, a oxidação do palmitato, a atividade da cadeia transportadora de elétrons (ETC) e o processo de fosforilação. As análises dos dados mostraram que tanto na subpopulação IFM quanto na SSM, o estado 3 e 4 e o controle respiratório permaneceram semelhante entre os grupos estudados como mostra a Tabela 3 abaixo.

Avaliando a atividade do complexo II, utilizando o substrato succinato e a rotenona (inibidor do complexo I), não observamos nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com diferentes doses do ácido linoleico e o grupo Sham (Tabela 3).

Tabela 3 -Avaliação da cadeia respiratória mitocondrial com os diferentes substratos

	Sham	AL5	AL15	AL50
Piruvato + Malato				
IFM				
Estado 3	211,65 ± 24,52	254,25 ± 14,35	287,98 ± 18,04	217,53 ± 21,18
Estado 4	88,76 ± 10,05	102,65 ± 6,27	91,46 ± 6,78	86,23 ± 4,67
RCR	2,68 ± 0,31	2,48 ± 0,09	2,66 ± 0,28	2,55 ± 0,22
SSM				
Estado 3	184,2 ± 24,24	186,18 ± 13,13	208,98 ± 11,02*	182,11 ± 19,08
Estado 4	78,1 ± 8,0	79,56 ± 4,18	92,26 ± 9,49	80,01 ± 8,22
RCR	2,36 ± 0,2	2,31 ± 0,14	2,18 ± 0,17	2,33 ± 0,26
Palmitoil-carnitina				
IFM				
Estado 3	219,8 ± 27,67	208,63 ± 28,57	191,63 ± 23,72	185 ± 16,71
Estado 4	105,2 ± 17,14	89,73 ± 11,63	100,03 ± 10,5	76,96 ± 5,49
RCR	2,5 ± 0,17	2,4 ± 0,24	1,95 ± 0,14	2,25 ± 0,2
SSM				
Estado 3	176,77 ± 35,64	152,41 ± 22,25	153,34 ± 8,66	187,67 ± 9,19
Estado 4	82,34 ± 18,43	68,0 ± 7,41	68,91 ± 5,33	78,71 ± 9,85
RCR	2,66 ± 0,36	2,25 ± 0,19	2,0 ± 0,12	1,98 ± 0,13
Rotenona + Succinato				
IFM				
Estado 3	409,26 ± 33,89	422,28 ± 30,35	474,62 ± 26,96	393,0 ± 34,23
Estado 4	187,44 ± 13,83	192,38 ± 8,26	193,28 ± 10,52	184,98 ± 12,27
RCR	2,22 ± 0,20	2,20 ± 0,16	2,18 ± 0,23	2,14 ± 0,16
SSM				
Estado 3	354,94 ± 36,07	340,16 ± 39,98	341,88 ± 16,06	344,06 ± 23,13
Estado 4	168,56 ± 11,79	151,01 ± 13,96	149,8 ± 13,18	164,98 ± 13,59
RCR	2,1 ± 0,15	2,25 ± 0,15	2,33 ± 0,13	2,11 ± 0,13

RCR = controle respiratório; IFM= mitocôndria intermiofibrilar; SSM= mitocôndria subsarcolemal. Resultados expressos em média ± EPM. ANOVA uma via seguida de pos-hoc de Fisher. * p<0,05 vs Sham. O número de animais entre 4 e 6 em cada grupo.

A fim de estudar o efeito do ácido linoleico na mitocôndria cardíaca de VE dois métodos padronizados foram utilizados para avaliar a mPTP induzida por Ca^{2+} .

4.4.3 Análise da resistência ao cálcio – *Swelling*

A mPTP foi avaliada a partir do *Swelling* mitocondrial induzido pelo Ca^{2+} elevado, como refletido pela diminuição da absorbância a 540 nm após a adição de Ca^{2+} nas mitocôndrias isoladas. A determinação da absorbância inicial antes da adição de Ca^{2+} foi realizada para determinar os valores basais. Houve uma diminuição na absorbância com adição do Ca^{2+} por mg de proteína

mitocodrial, tanto na concentração de 100 quanto à 500 nmol em todos os grupos estudados conforme figura 16 e 17. Entretanto, apenas no grupo AL50 que recebeu 100 nmol de Ca^{2+} (figura 16C) e no grupo AL5 (figura 17C) que recebeu 500 nmol foi encontrada diferença estatisticamente significativa em relação ao Sham. Estes resultados nos indicam que as duas subpopulações mitocondriais respondem de maneiras distintas a adição de Ca^{2+} .

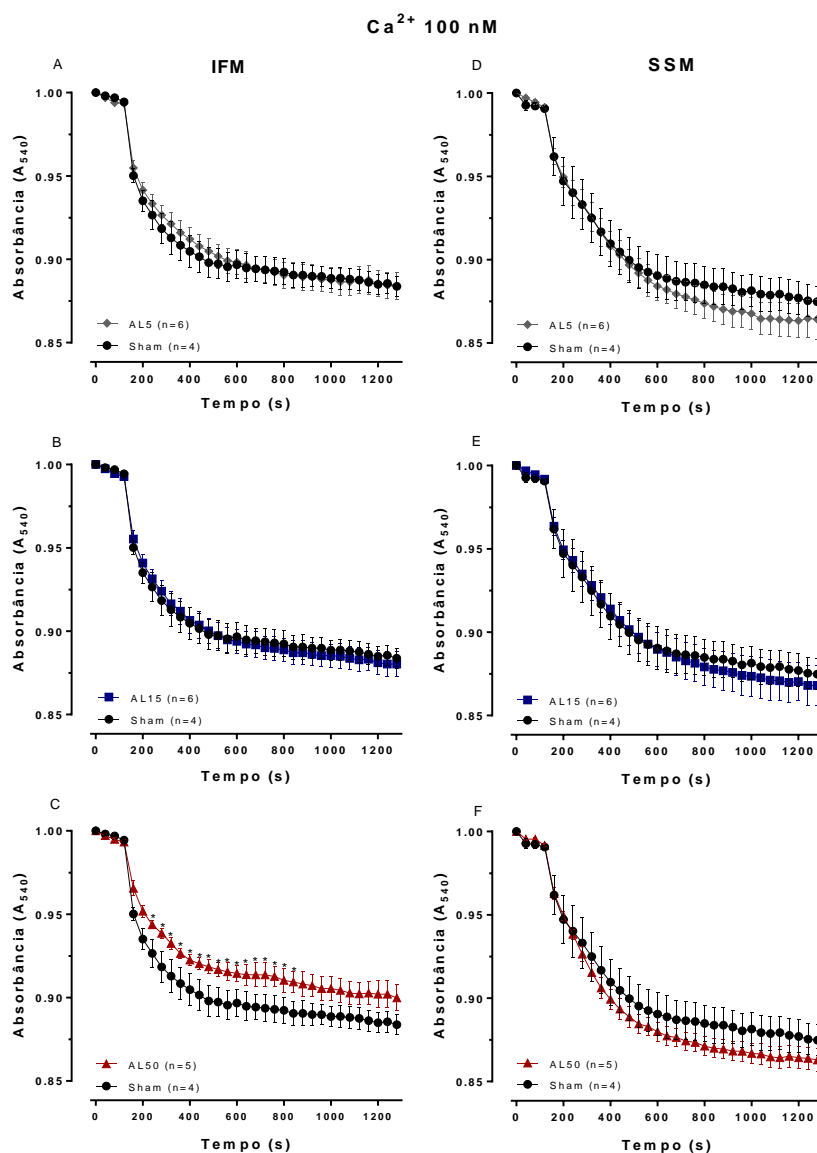


Figura 16 - Análise da resistência ao cálcio (*swelling*). Queda da absorbância após adição de cálcio na concentração final de 100 nM por μg de proteína mitocondrial em ambas as subpopulações mitocondriais (IFM e SSM) de ratos Sham, AL5, AL15 e AL50 após 15 dias. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de Fisher. * $p < 0,05$ vs Sham a partir de 200s. Número de animais é indicado entre parênteses.

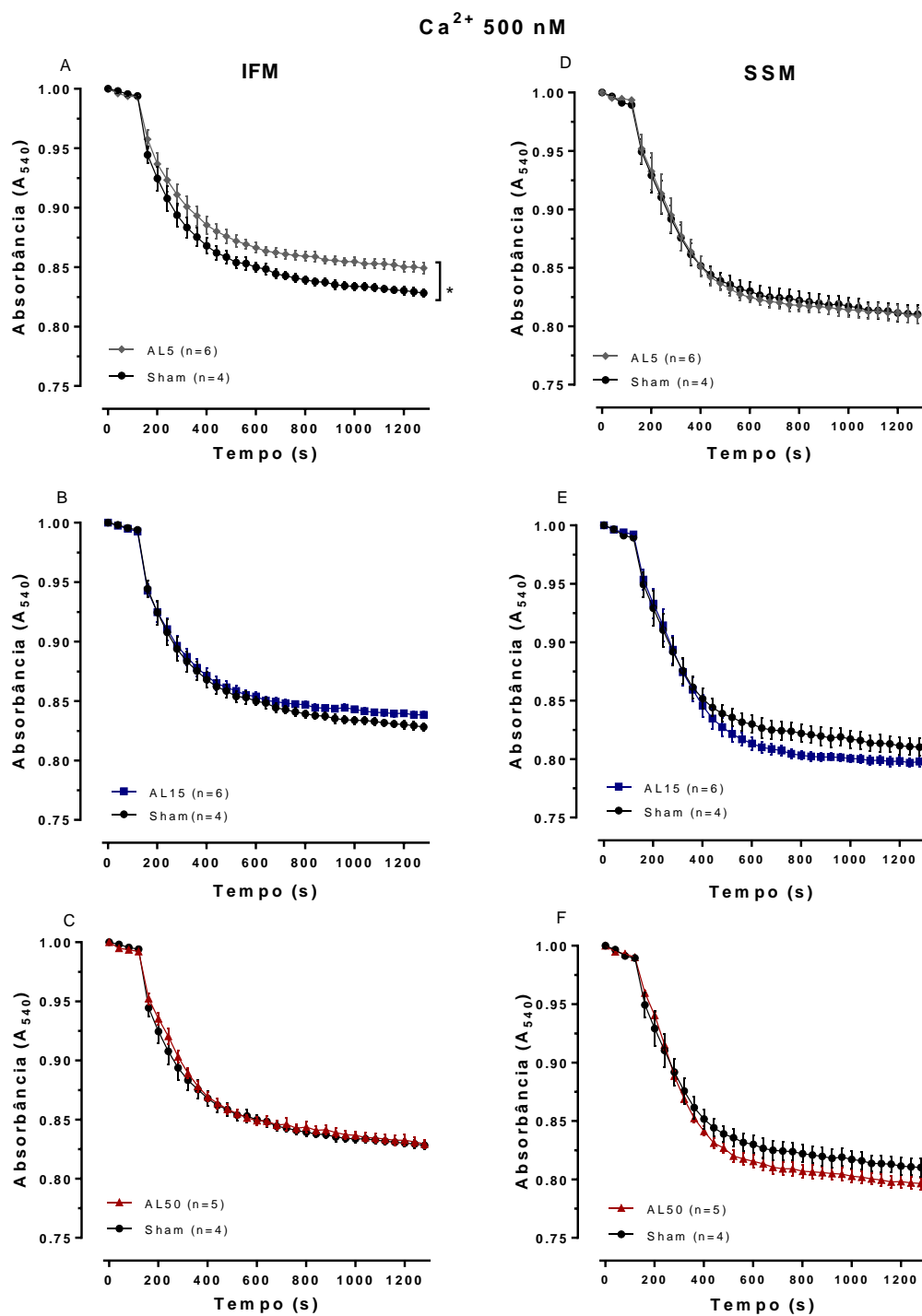


Figura 17 - Análise da resistência ao cálcio (*swelling*). Queda da absorbância após adição de cálcio na concentração final de 500 nM por μ g de proteína mitocondrial em ambas as subpopulações mitocondriais (IFM e SSM) de ratos Sham, AL5, AL15 e AL50 após 15 dias. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de Fisher. * $p < 0,05$ vs Sham a partir de 200s. Número de animais é indicado entre parênteses.

4.4.4 Probabilidade de abertura do poro mitocondrial

A captação de cálcio e abertura do poro mitocondrial entre os grupos estudados foi avaliada pelo método fluorimétrico na presença de um fluoróforo (*Calcium Green*), adicionado a um tampão livre de cálcio. Neste tampão foi adicionado 25 nM de Ca^{2+} por μg de proteína mitocondrial e, após a estabilização, iniciou-se a adição exponencial de cálcio (3,75 μM a cada 7 min por 32 vezes), para indução da abertura do poro mitocondrial.

De acordo com a Figura 18 observa-se que o tratamento com ácido linoleico aumentou a resistência ao cálcio, com diferença significativa na sensibilidade entre praticamente todos os valores dos grupos AL5 (figura 18A) e AL50 (figura 18B) em relação ao Sham, indicando menor probabilidade de abertura do poro mitocondrial na subpopulação IFM. Porém, não houve diferença significativa na subpopulação SSM entre os grupos estudados (Figura 18 D,E,F).

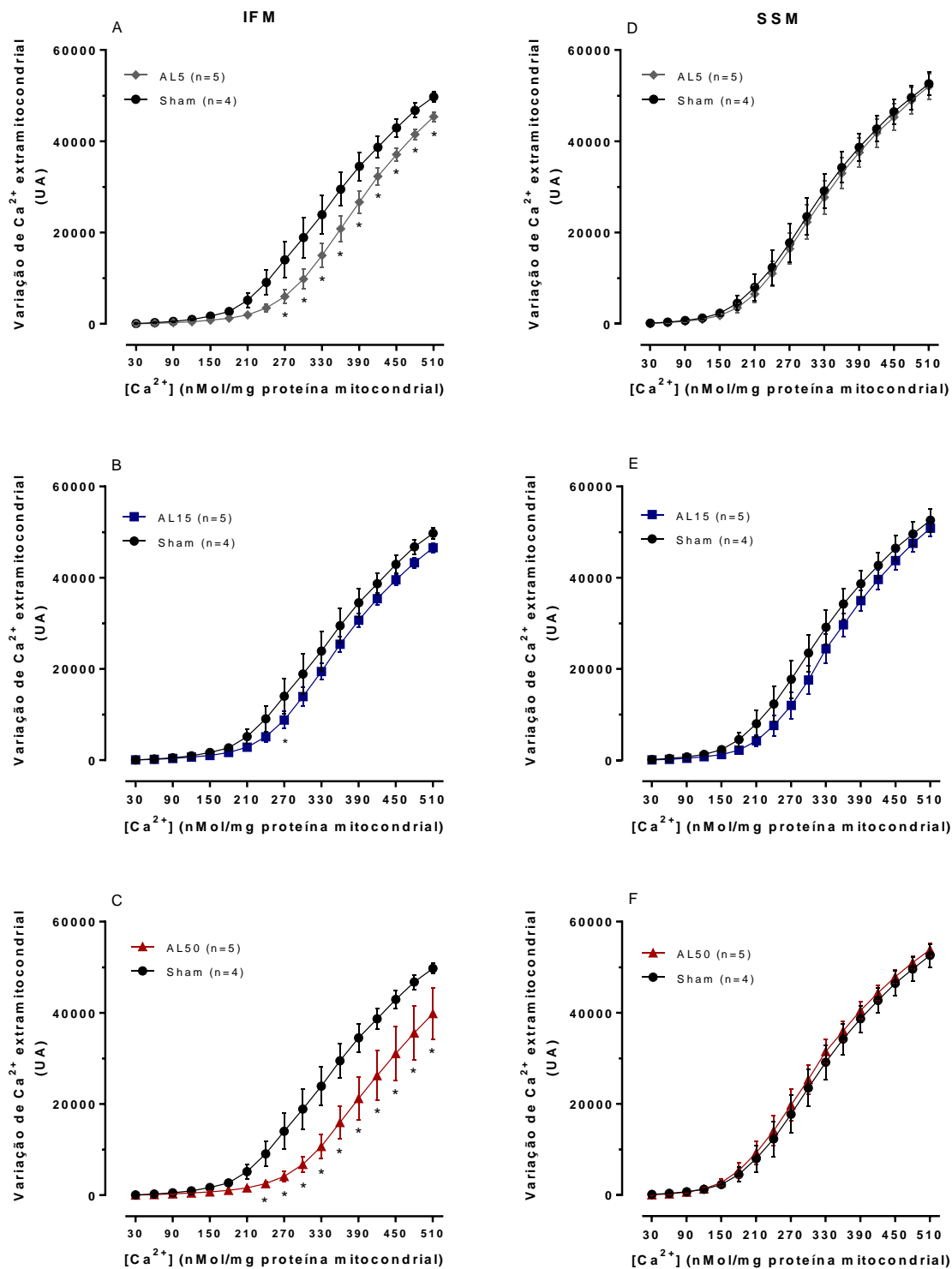


Figura 18 - Captação de cálcio e probabilidade de abertura do poro mitocondrial das frações interfibrilar (IFM) e subsarcolemal (SSM) de ratos Sham, AL5, AL15 e AL50 após 15 dias avaliados através da medida da variação de Ca^{2+} extramitocondrial (UA= Unidades Arbitrárias). ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de Fisher. * $p < 0,05$ vs Sham. O número de animais é indicado entre parênteses.

Após análise e interpretação dos resultados dos animais tratados com diferentes doses de ácido linoleico por 15 dias, demos início a segunda etapa do trabalho quando administramos a dose de 50 mg/Kg de animal i.m. em ratos submetidos ao infarto agudo do miocárdio. Essa foi a dose de escolha por interpretarmos como sendo a que mais benefícios trouxe ao animal Sham.

4.5 Análise de parâmetros: ponderal, morfométrico e funcional de ratos infartados após 15 dias de tratamento com ácido linoleico

Uma vez que optamos pelo modelo de disfunção cardíaca de etiologia isquêmica, decidimos realizar, *a priori*, uma caracterização da evolução da disfunção ventricular após a cirurgia de ligadura da artéria coronária descendente anterior nesse modelo. Para todos os experimentos analisamos parâmetros funcionais e/ou morfológicos, com o intuito de confirmar o quadro de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio.

Os parâmetros morfométricos e ponderais após 15 dias da cirurgia estão apresentados na Tabela 4. Os resultados mostram que o peso corporal inicial e o ganho de peso corporal após 15 dias foram semelhantes entre os grupos. No entanto, como era esperado, os animais dos grupos IM e IMAL, desenvolveram hipertrofia de VD e tiveram aumento do peso de pulmão (PP), consequente a cirurgia de oclusão permanente da artéria coronária descendente anterior esquerda.

Apesar de não encontramos esta diferença ao analisarmos a razão entre peso corporal e massa de VE entre os grupos, na análise histológica observamos um aumento do volume nuclear de animais submetidos a cirurgia de infarto do miocárdio (figura 19 C). Esses dados associados a uma área de infarto maior que 30%, conforme planimetria realizada e cortes histológicos (figura 19B), nos permite inferir que houve hipertrofia de VE pelo aumento do volume nuclear apesar do peso de VE ter sido similar entre os grupos. Corroborando com a literatura, nossos achados demonstram um remodelamento cardíaco após 15 dias de cirurgia de infarto do miocárdio caracterizado pelo aumento da massa cardíaca em resposta ao aumento do estresse hemodinâmico e neuro-hormonal, culminando em um rearranjo nas vias de sinalização celular (Chatterjee, 2005).

Para confirmar o estresse hemodinâmico nesse modelo experimental, realizamos medidas direta, nos animais anestesiados, da FC e das pressões arterial e ventricular. Como demonstrado na Tabela 4, não encontramos diferença na FC entre os grupos, no entanto, houve diminuição da PAS, PAD e PSVE duas semanas após a cirurgia de infarto do miocárdio em relação aos grupos Sham e AL.

A fim de confirmar mais uma vez que o modelo foi eficaz no desenvolvimento de infarto do miocárdio, realizamos também a quantificação do volume de colágeno cardíaco, e os animais submetidos à cirurgia de ligadura da artéria coronária descendente anterior apresentaram um aumento significativo na deposição de colágeno no coração em relação aos grupos Sham e AL (figura 19D). Esse achado reflete a progressão da disfunção ventricular, uma vez que o processo do remodelamento cardíaco patológico envolve mudanças adaptativas e não adaptativas na morfologia do cardiomiócito, fibrose cardíaca e inflamação (Stefanon et al, 2013).

Importante ressaltar que o tratamento com ácido linoleico por 15 dias não foi capaz de alterar o ganho de peso, os parâmetros morfométricos nem hemodinâmicos dos animais.

Tabela 4 - Parâmetros ponderais, morfométricos e hemodinâmicos após 15 dias de IM ou cirurgia fictícia de animais tratados com salina ou AL

	Sham	AL	IM	IMAL
PC-inicial, g	280,8 ± 6,0	290,8 ± 8,4	292,7 ± 10,1	275,7 ± 6,7
PC-final, g	333,2 ± 8,2	330,7 ± 11,7	331,0 ± 13,3	316,6 ± 10,8
VE/PC, mg/g	2,49 ± 0,13	2,88 ± 0,31	2,57 ± 0,26	2,69 ± 0,21
VD/PC, mg/g	0,65 ± 0,019	0,69 ± 0,05	0,97 ± 0,10 *	0,92 ± 0,10 *
PP/PC, mg/g	5,01 ± 0,24	4,84 ± 0,21	6,65 ± 0,42 *	5,89 ± 0,33 *
PF/PC, mg/g	37,57 ± 1,54	36,15 ± 1,33	39,40 ± 2,04	40,33 ± 1,72
FC, bpm	308 ± 9	319 ± 18	332 ± 14	325 ± 12
PAS, mmHg	102,10 ± 5,75	96,84 ± 4,96	87,00 ± 2,73*	93,34 ± 1,83*
PAD, mmHg	76,43 ± 3,87	65,26 ± 4,66	57,22 ± 4,37*	64,74 ± 2,68*
PSVE, mmHg	111,09 ± 3,07	109,27 ± 1,73	94,38 ± 2,91*	100,49 ± 1,39*
PDfVE, mmHg	6,43 ± 0,89	4,84 ± 0,72	5,63 ± 1,16	6,72 ± 1,16
+dP/dt VE, mmHg/s	6856 ± 761	6860 ± 876	5686 ± 266	5784 ± 263
-dP/dt VE, mmHg/s	- 5953 ± 51	- 5648 ± 494	- 5145 ± 294	- 5257 ± 296

Peso corporal inicial (PC inicial); Peso corporal final (PC final); Relação peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal (VE/PC); Relação peso do ventrículo direito pelo peso corporal (VD/PC), Relação peso dos pulmões pelo peso corporal (PP/PC); Relação peso do fígado pelo peso corporal (PF/PC); frequência cardíaca (FC); Pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD); pressão sistólica isovolumétrica de ventrículo esquerdo (PSIVE); pressão diastólica final de ventrículo esquerdo (PDfVE); derivadas positiva (+dP/dt) e negativa (-dP/dt) de pressão desenvolvidas pelo ventrículo esquerdo (VE) de animais Shame IM tratados com salina ou 50 mg/Kg de ácido linoleico. Resultados expressos em média ± EPM. ANOVA duas vias seguida de pos-hoc de Fisher. * p<0,05 vs Sham Número de animais entre 11 e 14 por grupo.

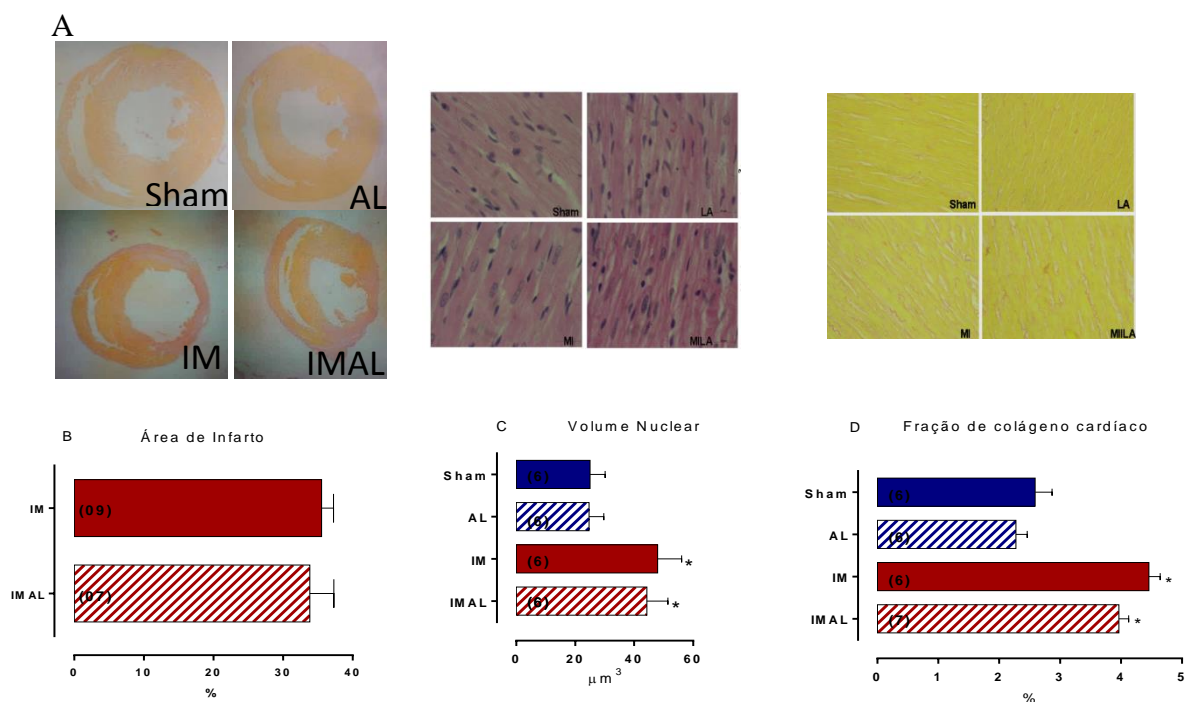


Figura 19 - Ácido linoleico não altera o remodelamento cardíaco patológico de ratos submetidos a infarto do miocárdio. (A) Fotomicrografia representativa de animais Sham, IM tratados ou não com AL mostrando morfologia do coração infartado, volume nuclear (aumento original x 1000) e deposição de colágeno (aumento original x 400) em tecido remanescente de VE (painel superior); (B) área de infarto (%), (C) volume nuclear (μm^3) e (D) fração de colágeno cardíaco (%). Resultados expressos em média \pm EPM. Teste T-Student ou ANOVA duas vias seguida de pos-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ vs Sham. Número de animais é indicado entre parênteses.

4.6 Efeito do ácido linoleico sobre a disfunção cardíaca em coração isolado

A Figura 20 A mostra o registro das pressões sistólicas de VE obtidas pelo método de perfusão de coração isolado através do método de Langendorff, utilizado para avaliar a resposta inotrópica ventricular de animais Sham, AL, IM e IMAL. Os resultados mostram que o aumento da PD promove o incremento da PSIVE de maneira diferente entre os grupos. Após 15 dias da cirurgia, os animais infartados desenvolvem PSIVE menor que os animais que foram submetidos à cirurgia fictícia (PD 15mmHg: IM $52 \pm 7,5$ mmHg vs Sham $110 \pm 4,6$ mmHg, $p < 0,05$) e que a intervenção com ácido linoleico foi capaz de impedir a disfunção cardíaca dos animais infartados com parâmetros iguais ao grupo Sham (PD 15mmHg: IMAL $88 \pm 12,2$ mmHg vs Sham $110 \pm 4,6$ mmHg)

O mesmo comportamento observamos em relação a resposta inotrópica ao cálcio (figura 20B). O tratamento com ácido linoleico promoveu aumento adicional da PSIVE em resposta a elevação das concentrações de cálcio em ambos os grupos (1,87 mM: Sham $128 \pm 8,6$ mmHg; AL $148 \pm 5,5^*$ mmHg; IM $54 \pm 9,0$ mmHg^{*}; IMAL $95 \pm 12,0$ mmHg[&]; *vs Sham; &vs IM; $p < 0,05$)

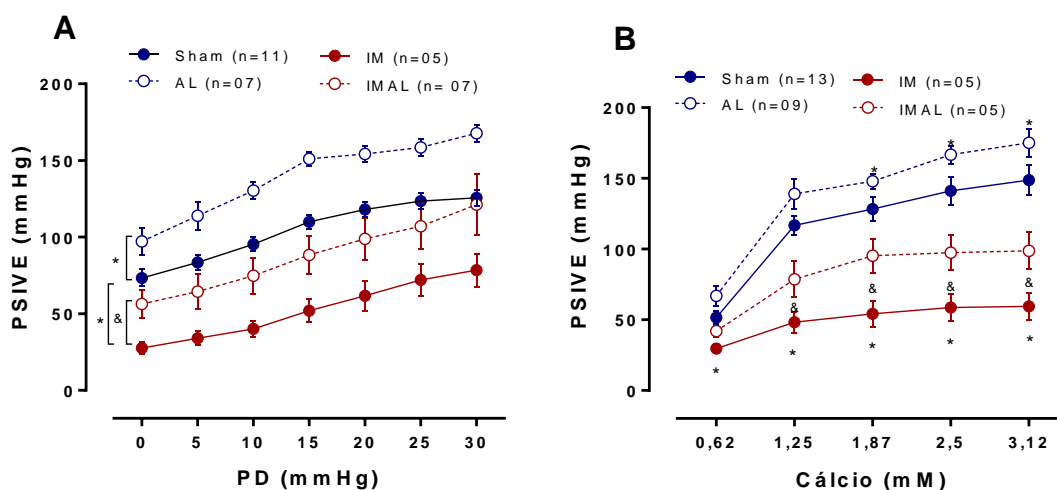


Figura 20 - O tratamento com ácido linoleico melhorou a contratilidade miocárdica de ratos infartados. PSIVE – pressão sistólica isovolumétrica do VE em cálcio 1,25 mM (A) e em diferentes concentrações de cálcio (B). Resultados expressos como média \pm EPM. ANOVA duas vias seguida de pos-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ vs Sham; & $p < 0,05$ vs IM. O número de animais é indicado entre parênteses.

4.7 Efeitos do ácido linoleico e do infarto do miocárdio na expressão de proteínas envolvidas na sinalização do cálcio

Para avaliar os possíveis mecanismos envolvidos na via de sinalização do cálcio que resultaram na melhora funcional observada no estudo de coração isolado, as expressões proteicas da SERCA2a e PLB foram medidas. A expressão da SERCA2a no grupo submetido ao infarto do miocárdio tratado com ácido linoleico (IMAL) aumentou em relação ao grupo Sham (Sham $0,81 \pm 0,06$ vs IMAL $1,01 \pm 0,06$; $p < 0,05$) (Figura 21A).

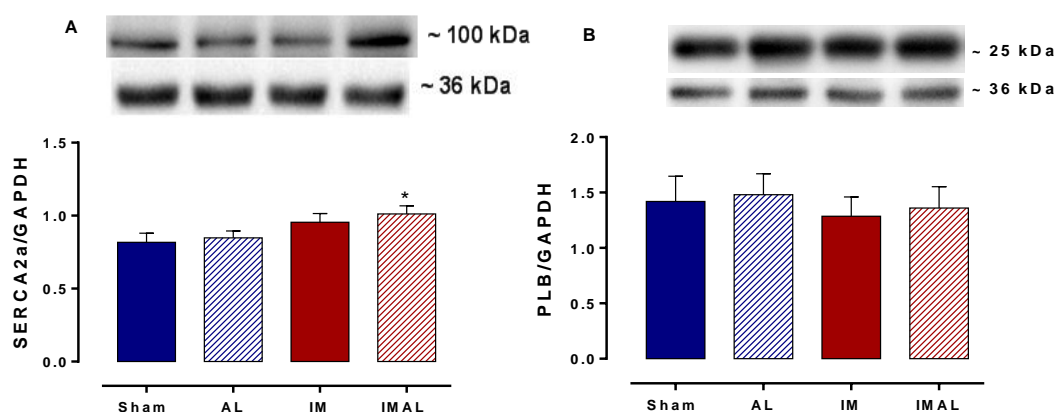


Figura 21 - Expressão proteica da SERCA2a (A) e do PLB (B) no ventrículo esquerdo dos grupos Sham, AL, IM e IMAL usando análise de densitometria pela técnica de Western Blot. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. ANOVA duas vias seguida de pos-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ vs Sham. 5 a 9 animais por grupo.

Sabendo-se que o aumento da concentração de cálcio intracelular induz aumento da contratilidade miocárdica com consequente ativação da fosfatase dependente de cálcio, e, que essa enzima controla a expressão de PGC1 α no músculo, analisamos também a expressão proteica de PGC1 α , do NRF1 e do PPAR α fatores de transcrição ou receptores nucleares por ele ativados.

A Figura 22A mostra que os animais infartados que receberam tratamento com ácido linoleico por 15 dias (IMAL) apresentaram aumento do PGC1 α em relação ao animal Sham (Sham $0,8 \pm 0,1$ vs IMAL $1,05 \pm 0,04$; $p < 0,05$). No entanto, ao avaliarmos a expressão proteica do NRF-1, observamos aumento no grupo IM em relação ao animal Sham (Sham $0,80 \pm 0,04$ vs IM $1,18 \pm 0,07$; $p < 0,05$). O tratamento dos animais infartados com ácido linoleico (IMAL) não modificou a expressão proteica comparado ao grupo Sham (Sham $0,80 \pm 0,04$; IM $1,18 \pm 0,07$; IMAL $0,89 \pm 0,06^{\&}$; $\&$ vs IM; $p < 0,05$), mas foi diferente em relação ao grupo IM (IM $1,18 \pm 0,07$ vs IMAL $0,89 \pm 0,06$; $p < 0,05$) (figura 22B).

Ao analisar o PPAR α observamos que o infarto do miocárdio não foi capaz de alterar sua expressão proteica, no entanto, houve redução no grupo Sham tratado com ácido linoleico (Sham $0,92 \pm 0,06$ vs AL $0,73 \pm 0,05$; $p < 0,05$) (figura 22C).

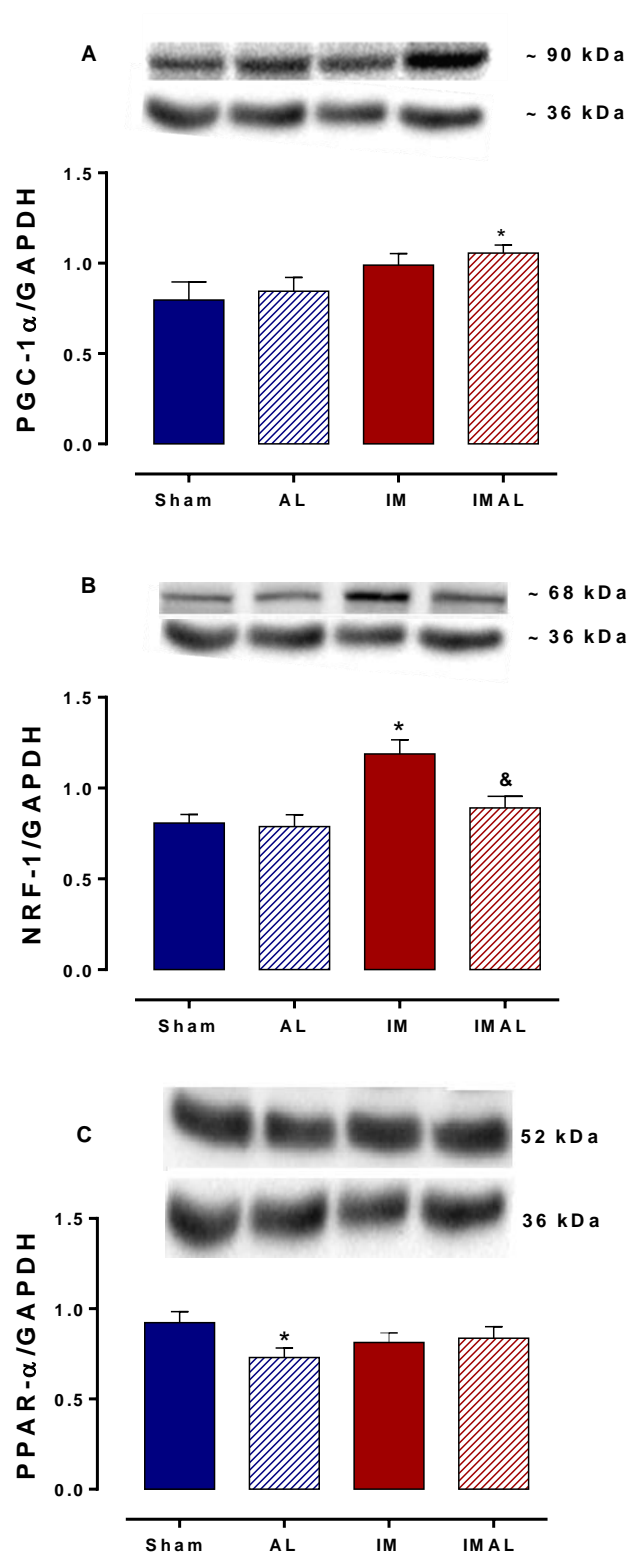


Figura 22 - Níveis proteicos de PGC1 α (A), NRF-1 (B) e PPAR α (C) do ventrículo esquerdo dos grupos Sham, AL, IM e IMAL obtidos na análise de densitometria pela técnica de Western Blot. Resultados expressos em média \pm EPM. ANOVA duas vias seguida de pos-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ vs Sham; & $p < 0,05$ vs IM. 5 a 10 animais por grupo.

Essas proteínas estudadas anteriormente controlam a biogênese mitocondrial e estão relacionadas a respiração mitocondrial, produção de energia e transporte e oxidação de ácidos graxos. Sendo assim, vamos analisar como as mitocôndrias cardíacas de ratos Wistar se comportaram frente ao infarto do miocárdio e ao tratamento com 15 dias de ácido linoleico.

4.7 Rendimento mitocondrial – *Yield*

Avaliamos a quantidade de proteína mitocondrial por grama de tecido para caracterizar o *yield*. Como já mostramos anteriormente, o AL não altera o rendimento proteico das subpopulação IFM e SSM. Entretanto, como esperado, os animais infartados apresentaram menor *yield* em comparação com os grupos Sham (IFM: Sham $8,13 \pm 0,06$; IM $4,11 \pm 0,63^*$; IMAL $3,47 \pm 0,5^*$ mg proteína mitocondrial/g tecido; SSM $11,4 \pm 0,85$; IM $7,24 \pm 0,56^*$; IMAL $8,0 \pm 0,33^*$ mg proteína mitocondrial/g tecido; $*p < 0,05$), porém o AL não foi capaz de restaurar esses valores para o normal (Sham), como mostra a Figura 23.

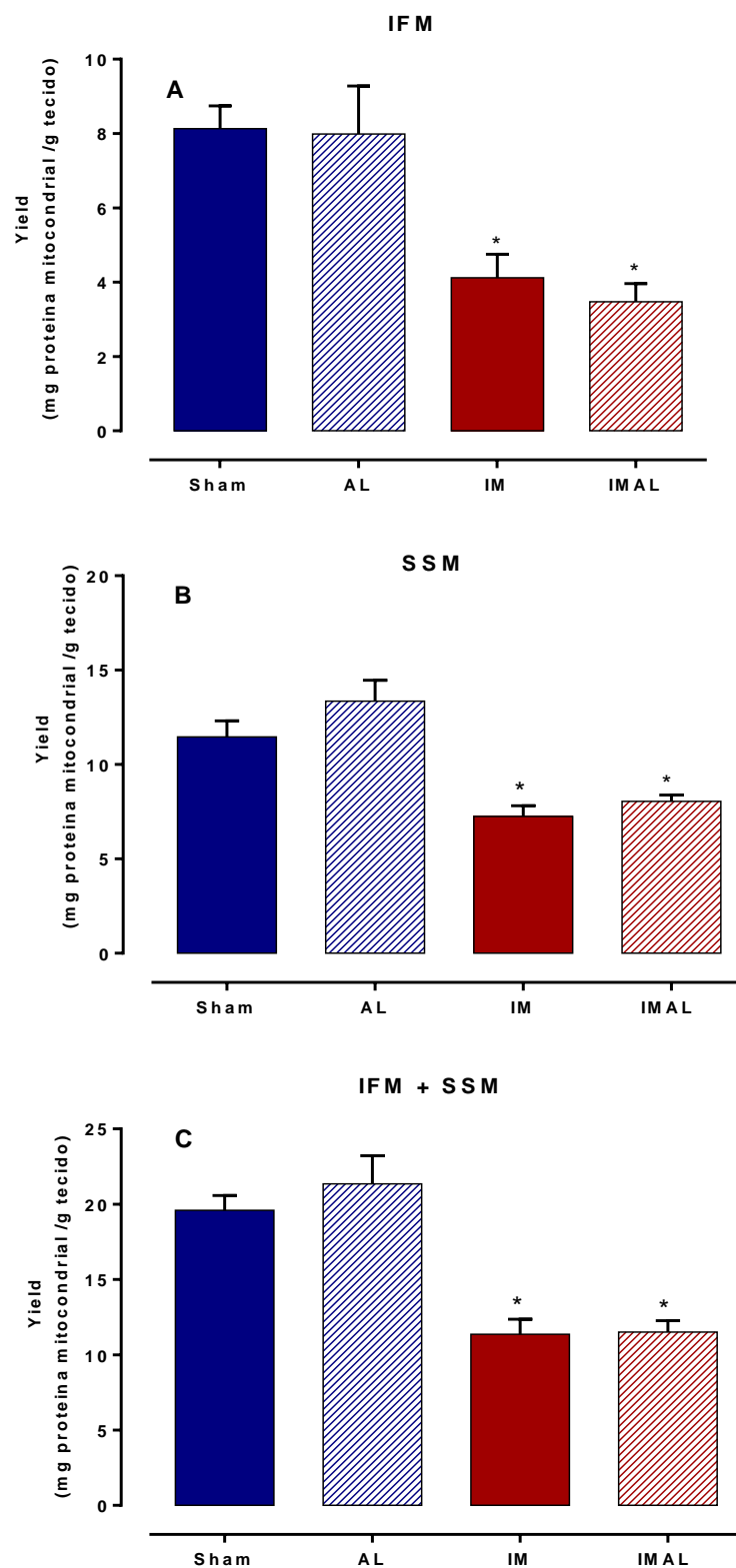


Figura 23 - (A) *Yield* mitocondrial na subpopulação interfibrilar (IFM), (B) *Yield* mitocondrial na subpopulação subsarcolemal (SSM) e (C) *Yield* mitocondrial total (IFM + SSM) obtidos do ventrículo esquerdo de animais Sham, AL, IM e IMAL. ANOVA duas vias seguida de pos-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ em relação ao Grupo Sham. 7 a 9 animais por grupo.

4.4 Caracterização da função e da morfologia mitocondrial por citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi utilizada para avaliar potencial de membrana, tamanho e a complexidade interna das subpopulações mitocondriais dos grupos Sham, AL, IM e IMAL.

O potencial de membrana das mitocôndrias foi analisado de maneira indireta nas duas subpopulações usando o marcador 5,5', 6,6'-tetra-cloro-1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazol iodeto de carbocianina (JC-1). O deslocamento da luz verde para a vermelha determina a intensidade da fluorescência e nos indica um aumento no potencial de membrana.

Na figura 24A e B é possível observar um aumento significativo do potencial de membrana mitocondrial em ambas subpopulações (IFM Sham $1,52 \pm 0,18$ vs IM $2,75 \pm 0,41$ UA; SSM Sham $1,54 \pm 0,23$ vs IM $2,78 \pm 0,36$ UA; $p < 0,05$), no entanto o AL foi capaz de manter o potencial de membrana em relação ao grupo Sham na subpopulação IFM (IMAL $2,09$).

Para estimar o tamanho das mitocôndrias foi utilizada a avaliação da luz difusa (*forward-scattered light* – FSC), enquanto que a avaliação da luz dispersa lateral (*side-scattered light* – SSC) nos permitiu estimar a complexidade interna mitocondrial, ambas baseadas em uma escala logarítmica.

Essas análises ajudam a mostrar diferenças morfológicas relativas entre as duas subpopulações e validar o sucesso do isolamento. Para avaliar as diferenças no tamanho absoluto das mitocôndrias, foram utilizadas microesferas (1 a 6 μm) para servir como referências de tamanho confiáveis.

Apenas os animais que receberam AL por 15 dias aumentaram o tamanho da mitocôndria na subpopulação IFM (Sham 11102 ± 1213 vs AL 16969 ± 889 UA $p < 0,05$) (figura 24C) sem alterar sua complexidade (Sham 1410 ± 63 vs AL 1878 ± 234 UA $p > 0,05$) (figura 24E). Nenhuma alteração de tamanho ou complexidade foi observada nos animais que foram submetidos a cirurgia de infarto do miocárdio. A subpopulação SSM de todos os grupos também permaneceu sem alteração (figura 24D e F).

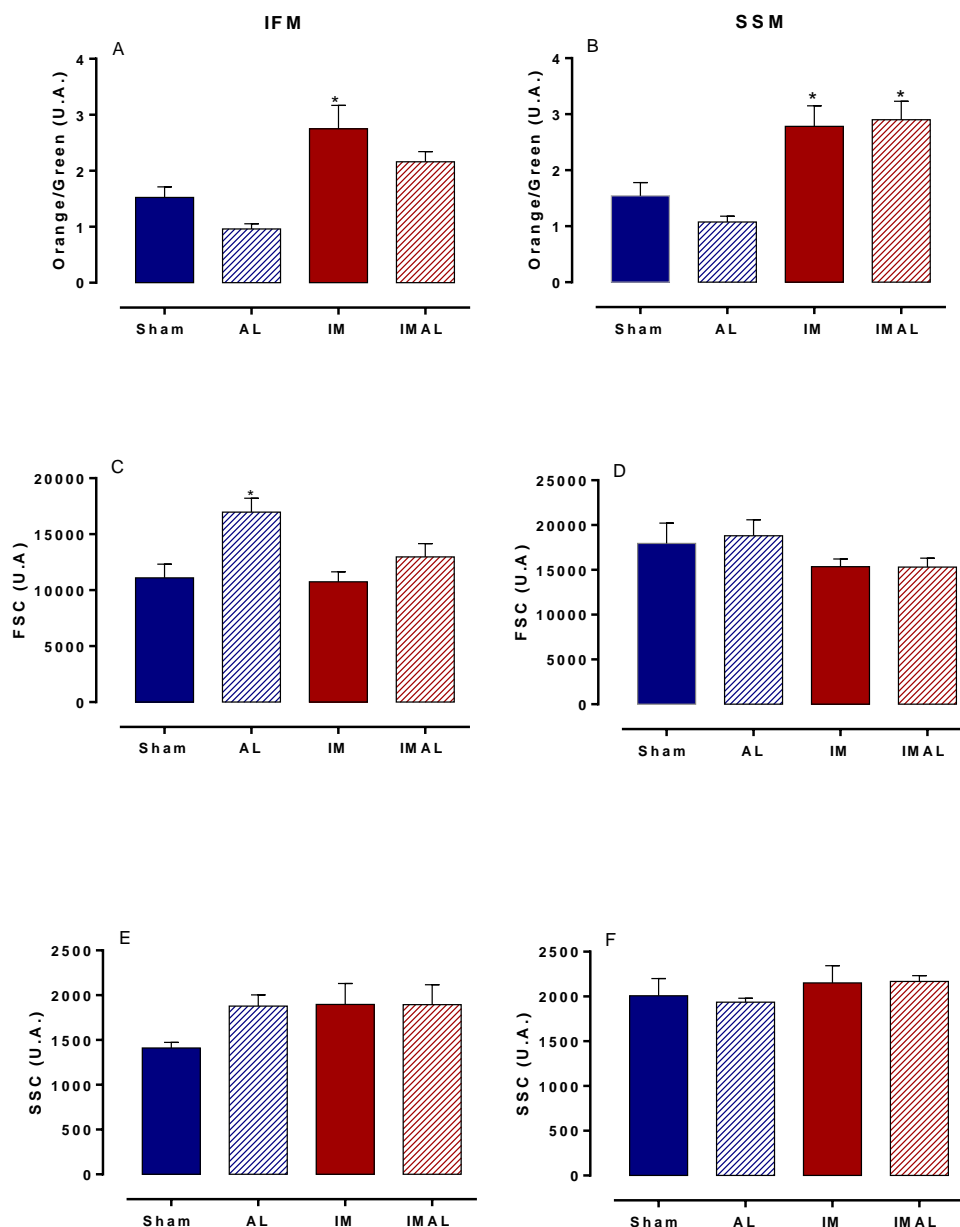


Figura 24 - Determinação da função e morfologia das subpopulações mitocondriais: subsarcolemal (SSM) e interfibrilar (IFM) de animais Sham, AL, IM e IMAL utilizando citometria de fluxo. A e B - Análise do potencial de membrana; C e D - Análise do tamanho (*forward-scattered light* – FSC); E e F - Análise da complexidade (*side-scattered light* – SSC). Os valores de potencial de membrana, o tamanho e a complexidade são expressos nas barras como unidades arbitrárias (UA). ANOVA duas vias seguida de pos-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ em relação ao Grupo Sham. 4 a 5 animais por grupo.

4.5 Caracterização da função mitocondrial cardíaca em modelo animal de disfunção cardíaca associado ao infarto do miocárdio: Efeito do ácido linoleico

Para avaliar o efeito do infarto do miocárdio e do ácido linoleico sobre a função mitocondrial cardíaca de ratos infartados optamos por fazer as análises na mitocôndria cardíaca isolada a fim de melhor quantificar os parâmetros funcionais da organela.

A respiração mitocondrial foi mensurada com diferentes substratos (glutamato + malato, piruvato + malato, palmitoil + carnitina e succinato + rotenona) que utilizam vias oxidativas distintas, transporte mitocondrial e fornecem elétrons via NADH e FAD para o Complexo I e II. Avaliamos o consumo de O₂ mitocondrial por meio da respiração máxima no Estado 3 e Estado 4 além do controle respiratório, que compreende a razão do Estado 3 pelo Estado 4.

A fim de facilitar o entendimento, os resultados aqui serão subdivididos de acordo com a população estudada.

4.5.1 Subpopulação Intermiofibrilar – IFM

Corroborando os achados anteriores da mecânica cardíaca, que nos mostrou disfunção ventricular em animais submetidos a cirurgia de infarto do miocárdio, as figuras 25A nos mostra redução na função mitocondrial por apresentar redução do RCR no grupo IM quando comparado aos animais Sham (G + M: Sham $2,94 \pm 0,24$ vs IM $1,81 \pm 0,17^*$; P + M: Sham $2,40 \pm 0,26$ vs IM $1,97 \pm 0,2$; PC: Sham $2,33 \pm 0,14$ vs IM $2,11 \pm 0,13$; R + S: $2,25 \pm 0,17$ vs IM $1,75 \pm 0,11$; * $p < 0,05$ vs Sham) . Além disso, o AL foi eficaz em aumentar o RCR nos animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio apenas no substrato glutamato + malato (Sham $2,94 \pm 0,24$; IM $1,81 \pm 0,17^*$; IMAL $2,55 \pm 0,37^{\&}$; * vs Sham; $\&$ vs IM; $p < 0,05$).

Observa-se também na Figura 25B que o grupo IM apresentou uma diminuição no consumo máximo de O₂ mitocondrial em cada estado respiratório. No estado 3, para todos os substratos utilizados, o grupo IM foi estatisticamente menor quando comparado ao grupo Sham e o tratamento com ácido linoleico foi capaz de manter o consumo fisiológico após 15 dias de

tratamento (G +M: Sham 144 ± 20 ; IM $59\pm 9^*$; IMAL $200\pm 27^{\&}$; P + M: Sham 194 ± 21 ; IM $70\pm 8^*$; IMAL $197\pm 16^{\&}$; PC Sham 171 ± 10 ; IM $103\pm 7^*$; IMAL $154\pm 16^{\&}$; R + S: Sham 304 ± 22 ; IM $208\pm 19^*$; IMAL 249 ± 22 atoms O mg. proteína mitocondrial-1.min-1; * vs Sham; & vs IM; $p<0,05$). Enquanto no estado 4 apenas no piruvato + malato e no palmitoil + carnitina, o grupo IM apresentou redução estatisticamente significativa que foi mantida a nível do Sham com o uso de AL (P + M: Sham 83 ± 4 ; IM $49\pm 5^*$; IMAL $74\pm 5^{\&}$; PC: Sham 66 ± 5 ; IM $51\pm 3^*$; IMAL $66\pm 5^{\&}$ atoms O mg. proteína mitocondrial-1.min-1; * vs Sham; & vs IM; $p<0,05$) (figura 25C).

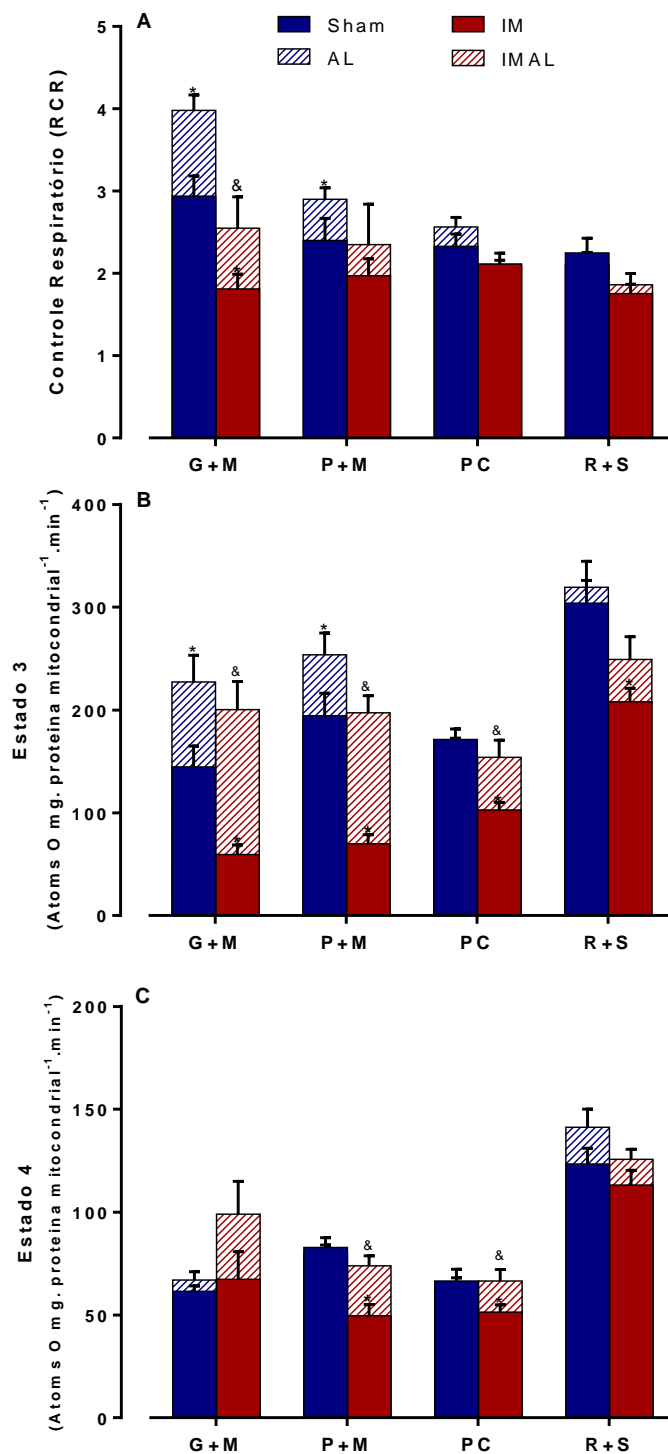


Figura 25 - O tratamento com ácido linoleico foi capaz de restaurar a função mitocondrial de animais submetidos a cirurgia de infarto do miocárdio na subpopulação intermiofibrilar (IFM). Controle respiratório mitocondrial (Estado 3/ Estado 4) (A); respiração máxima no Estado 3 (B); respiração máxima no Estado 4 (C) dos grupos dos grupos Sham, IM, AL e IMAL. ANOVA duas vias seguida de pos-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ vs Sham; & $p < 0,05$ vs IM. O número de animais entre 6 e 11 por grupo.

Esses dados podem indicar uma diminuição na quantidade de complexos respiratórios da CTE. Para confirmar essa hipótese avaliamos a expressão proteica dos complexos I, II, III, IV e V da CTE pela técnica de *Western Blotting*, conforme demonstrado na Figura 26. Como podemos observar, os grupos IM e IMAL apresentaram uma diminuição na expressão proteica dos complexos respiratórios III, IV e V quando comparados ao grupo Sham (estado III: Sham $2,42 \pm 0,5$; IM $0,88 \pm 0,1^*$, IMAL $0,88 \pm 0,1^*$; estado IV: Sham $1,85 \pm 0,4$; IM $0,78 \pm 0,1^*$; IMAL $0,80 \pm 0,1^*$; estado V: Sham $2,42 \pm 0,6$; IM $0,84 \pm 0,1^*$; IMAL $0,69 \pm 0,1^*$; * $p < 0,05$ vs Sham). Por outro lado nenhuma diferença pode ser observada nos animais infartados quando comparados ao Sham nos complexos I e II. Cabe salientar que a similaridade na expressão dos complexos respiratórios não significa uma atividade semelhante dos mesmos, pois alterações pós-traducionais dos complexos podem resultar em disfunção da CTE e consequente progressão da disfunção contrátil nas doenças cardiovasculares (Nojiri et al., 2006).

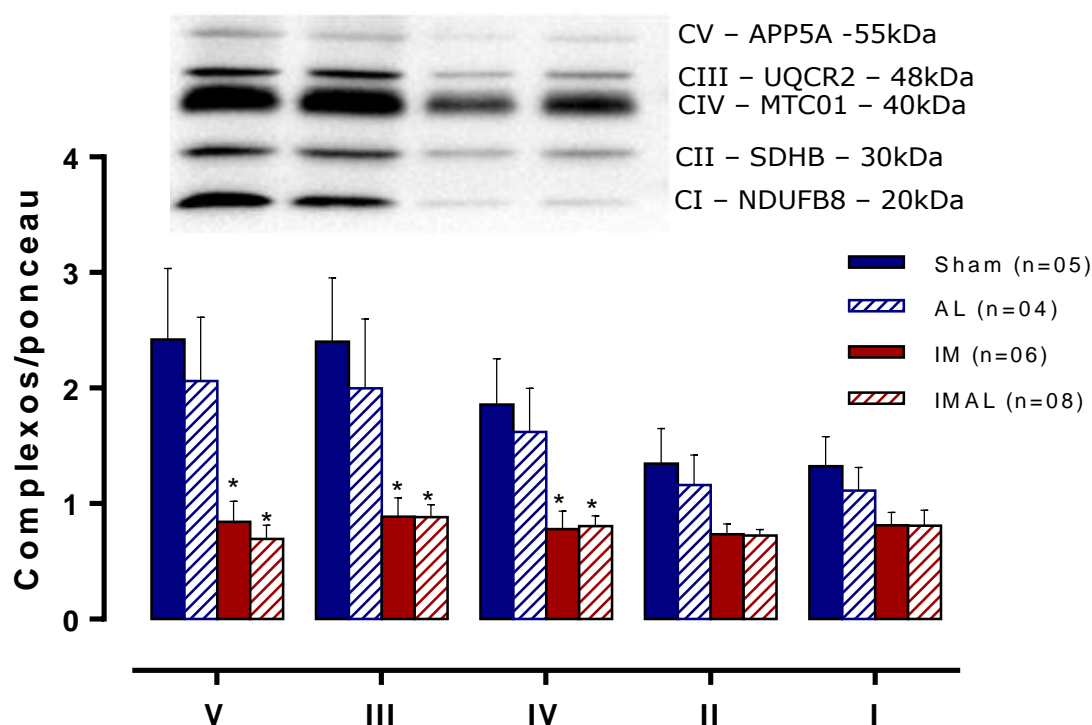


Figura 26 - Expressão proteica dos complexos respiratórios da cadeia transportadora de elétrons na disfunção cardíaca da subpopulação IFM: efeitos do ácido linoleico por 15 dias dos grupos dos grupos Sham, IM, AL e IMAL. ANOVA duas vias seguida de pos-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ vs Sham; & $p < 0,05$ vs IM. O número de animais indicado entre parênteses.

Entretanto, isto não elucida a melhora da mecânica cardíaca em animais tratados com ácido linoleico por 15 dias após cirurgia de infarto do miocárdio. Avaliamos então a captação de cálcio e a abertura dos poros mitocondriais utilizando a adição de Ca^{2+} 3,75 μM . Neste ensaio, foi possível mostrar que a mitocôndria cardíaca dos animais submetidos a cirurgia de infarto do miocárdio possui um alto limiar ao Ca^{2+} quando comparada ao grupo Sham (360nMol/mg proteína: Sham 43019 ± 7967 ; IM $18339 \pm 3782^*$; IMAL $7999 \pm 2903^*$; * $p < 0,05$ vs Sham) (Figura 27).

Observa-se que os animais submetidos à cirurgia de infarto tratados ou não com AL aumentaram a resistência ao cálcio em relação ao Sham. Como consequência, houve diferença significativa na sensibilidade entre praticamente todos os valores de proteína mitocondrial, indicando menor probabilidade de abertura do poro. Importante ressaltar que nos valores entre 360 e 420 nM/ μg de proteína mitocondrial o grupo IMAL é diferente do grupo IM, sugerindo que o ácido linoleico é capaz de alterar, em parte, a resistência ao cálcio e a probabilidade de abertura do poro mitocondrial.

Esse resultado indica que a organela do grupo IM mantém sua integridade estrutural, e consequentemente sua função. O tratamento com AL por 15 dias aumenta o limiar ao Ca^{2+} , tanto em animais do grupo IM quando do grupo AL.

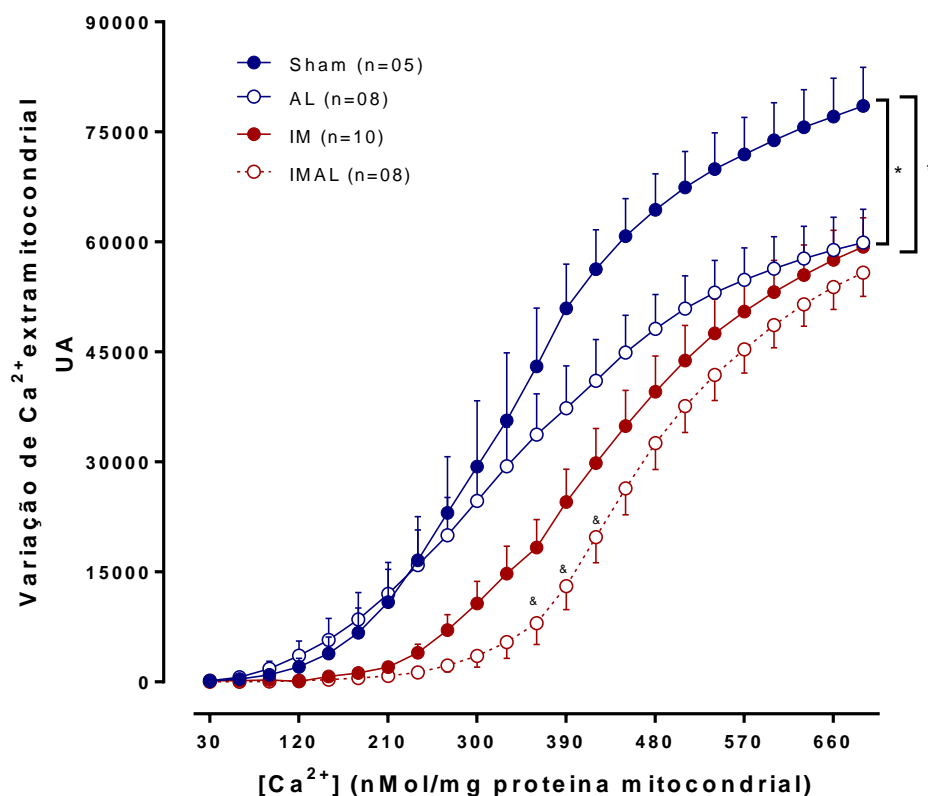


Figura 27 - Captação de cálcio e probabilidade de abertura do poro mitocondrial da fração interfibrilar (IFM) de ratos Sham, IM, AL e IMAL. ANOVA duas vias seguida de pos-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ vs Sham; & $p < 0,05$ vs IM. O número de animais está indicado entre parênteses.

Completando a análise referente ao comportamento da mitocôndria cardíaca de coração isolado frente à exposição de cálcio, foi avaliado o *swelling* mitocondrial induzido pelo Ca^{2+} elevado. A estimativa foi feita avaliando a diminuição da absorbância a 540 nm após a adição de Ca^{2+} nas mitocôndrias isoladas.

As figuras 28 A e B mostram que houve uma diminuição na absorbância com adição do Ca^{2+} por mg de proteína, tanto na concentração de 100 quanto à 500 nmol em todos os grupos estudados (Sham, AL, IM e IMAL). Entretanto, foi encontrada diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos IM e IMAL em relação ao Sham (Ca 100nM em 1200s: Sham $0,72 \pm 0,02$; IM $0,83 \pm 0,03^*$; IMAL $0,81 \pm 0,04^*$. Ca 500nM em 1200s: Sham $0,70 \pm 0,02$; IM $0,75 \pm 0,01^*$; IMAL $0,76 \pm 0,01^*$; * $p < 0,05$ vs Sham).

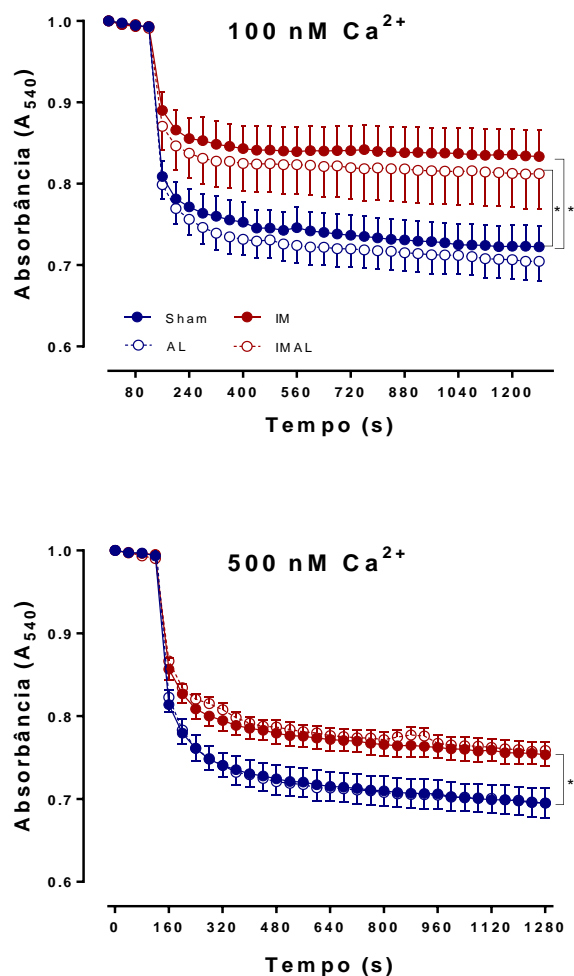


Figura 28 - Análise da resistência ao cálcio (*Swelling*). Queda da absorbância após adição de cálcio na concentração final de 100 e 500 nM por μ g de proteína na subpopulação intermiofibrilar (IFM) de ratos Sham, IM, AL e IMAL. ANOVA duas vias seguida de pos-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ vs Sham. 6 a 8 animais por grupo.

4.5.2 Subpopulação Subsarcolemal – SSM

Esta subpopulação é localizada logo abaixo do sarcolema e sua produção de ATP é utilizada para contração das miofibrilas (Hollander et al, 2014) e para manter o transporte ativo de eletrólitos e metabólitos através da membrana celular, não sendo responsável direto por gerar energia para manter a maquinaria contrátil (Palmer et al, 1977).

A Figura 29 A mostra que o controle respiratório é semelhante entre os grupos estudados, sugerindo que a disfunção ventricular encontrada nos grupos submetidos a cirurgia de infarto não foi capaz de alterar a função mitocondrial da subpopulação SSM.

No entanto, também observa-se nesta subpopulação a diminuição do consumo máximo de O_2 (estado 3) nos grupos IM em relação ao Sham e que o AL foi capaz de manter este consumo ao nível do Sham apenas nos substratos Piruvato + Malato e Palmitoil + Carnitina (G + M: Sham 153 ± 22 ; IM $68 \pm 14^*$, IMAL $96 \pm 17^*$; P + M: Sham 158 ± 18 ; IM $87 \pm 14^*$; IMAL $170 \pm 17^{\&}$; PC: Sham 146 ± 15 ; IM $74 \pm 12^*$; IMAL $118 \pm 16^{\&}$; R + S: Sham 252 ± 24 ; IM $176 \pm 11^*$; IMAL $207 \pm 22^*$ atoms O mg. proteína mitocondrial-1.min-1; * vs Sham; $\&$ vs IM; $p < 0,05$) (Figura 29 B).

Ao avaliarmos o estado 4 também encontramos prejuízo nos grupos IM em todos os substratos utilizados, exceto Piruvato + Malato, porém o tratamento com AL por 15 dias foi capaz de manter ao nível do Sham quando Glutamato + Malato foi utilizado (G + M: Sham 53 ± 4 ; IM $30 \pm 0,6^*$; IMAL 43 ± 3 ; P + M: Sham 66 ± 5 ; IM $55 \pm 8^*$; IMAL 73 ± 6 ; PC Sham 61 ± 5 ; IM $48 \pm 3^*$; IMAL 51 ± 5 ; R + S: Sham 130 ± 6 ; IM $101 \pm 3^*$; IMAL 133 ± 3 atoms O mg. proteína mitocondrial-1.min-1) (Figura 29 C).

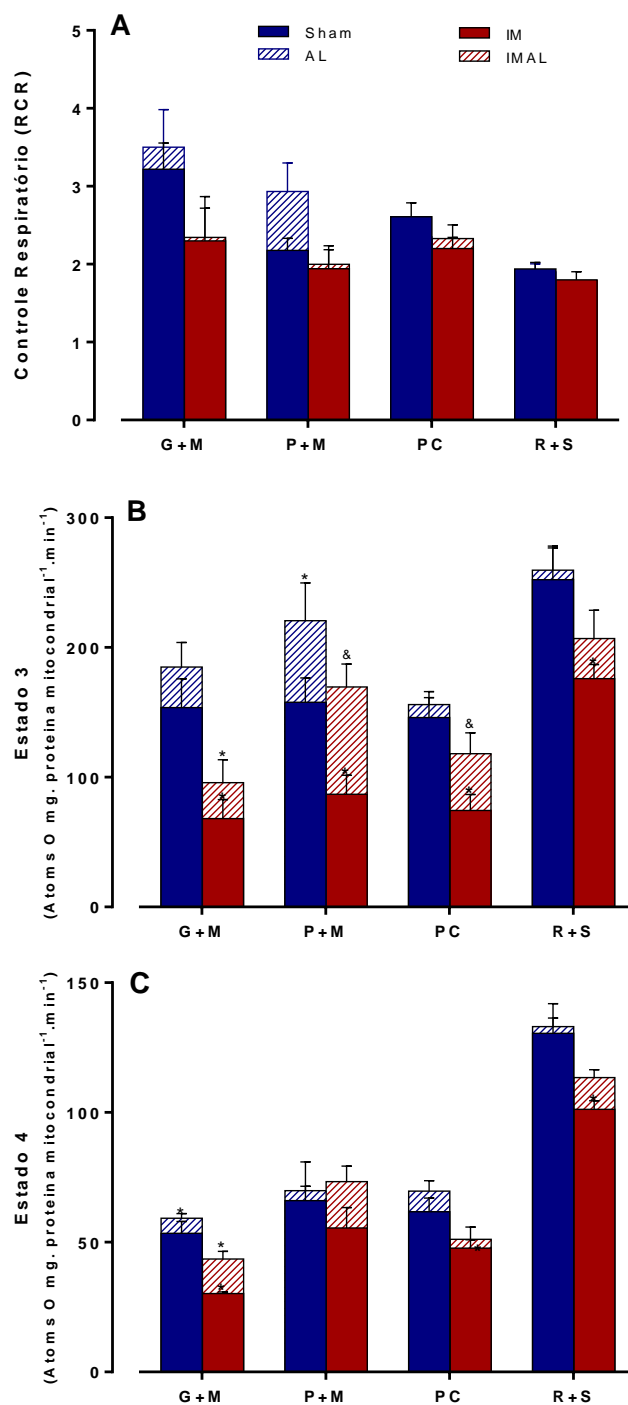


Figura 29 - Função mitocondrial da subpopulação subsarcolemal (SSM) de animais submetidos a cirurgia de infarto do miocárdio tratados com AL por 15 dias. Controle respiratório mitocondrial (Estado 3/ Estado 4) (A); respiração máxima no Estado 3 (B); respiração máxima no Estado 4 (C) dos grupos dos grupos Sham, IM, AL e IMAL. ANOVA duas vias seguida de pos-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ vs Sham; & $p < 0,05$ vs IM. O número de animais entre 6 e 8.

Como descrito na subpopulação IFM, esses achados podem ser associados com a quantidade de complexos da cadeia respiratória. De acordo com a Figura 30, o AL em animais infartados (IMAL) provoca um aumento estatisticamente significativo em relação ao Sham e em relação ao grupo IM (complexo I: Sham $1,81 \pm 0,12$; IM $1,81 \pm 0,33$; IMAL $3,22 \pm 0,35^{*,\&}$; complexo II: Sham $1,70 \pm 0,17$; IM $1,43 \pm 0,07$; IMAL $3,44 \pm 0,72^{*,\&}$ complexo III: Sham $1,61 \pm 0,15$; IM $1,68 \pm 0,31$; IMAL $3,83 \pm 0,44^{*,\&}$ complexo IV: Sham $2,18 \pm 0,23$; IM $2,33 \pm 0,3$; IMAL $34,18 \pm 0,61^{*,\&}$; * vs Sham; & vs IM; $p < 0,05$). Mesmo não sendo observada uma diminuição nos complexos no grupo IM, isso não significa uma atividade semelhante entre os grupos, pois como dito anteriormente, alterações pós-traducionais dos complexos podem resultar em disfunção da CTE e consequente progressão da disfunção contrátil nas doenças cardiovasculares (Nojiri et al., 2006).

Em conjunto, esses dados apontam o ácido linoleico como um importante modulador positivo da função mitocondrial cardíaca.

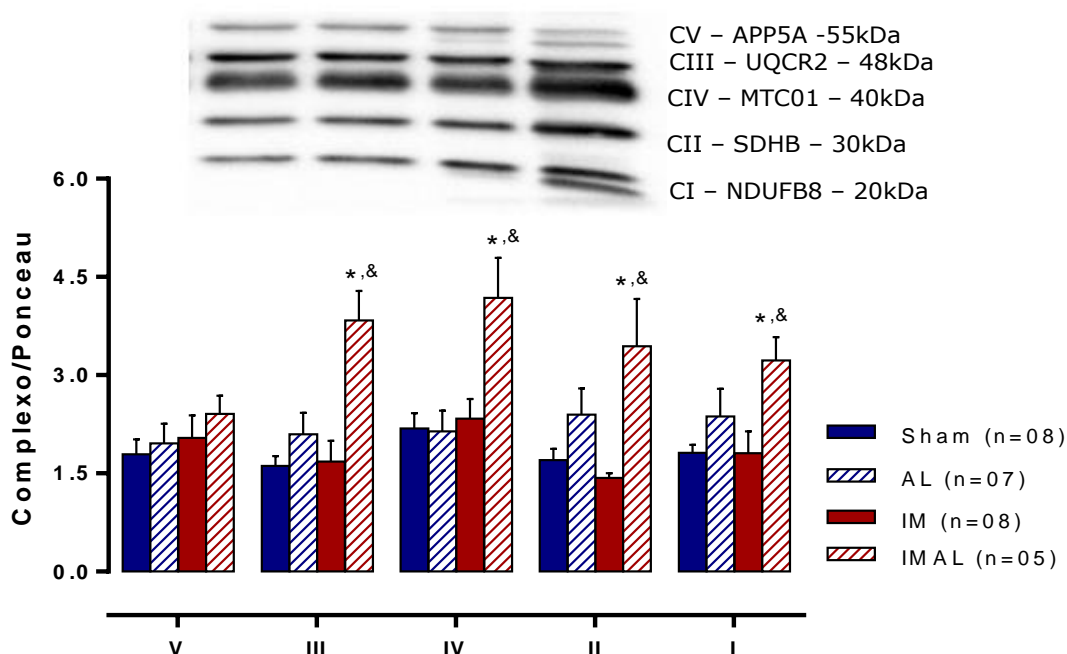


Figura 30 - Expressão proteica dos complexos respiratórios da cadeia transportadora de elétrons na subpopulação SSM: efeitos do ácido linoleico por 15 dias dos grupos dos grupos Sham, IM, AL e IMAL. ANOVA duas vias seguida de pos-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ vs Sham; & $p < 0,05$ vs IM. O número de animais está indicado entre parênteses.

Dando continuidade a nossa investigação, estudamos o comportamento da subpopulação SSM frente a adição de Ca^{2+} 3,75 μM a cada 7 min por 32 vezes na mitocôndria incubada em um tampão livre de cálcio, na presença do marcador de cálcio (*calcium green 5N*), para avaliarmos a captação de cálcio e a abertura dos poros mitocondriais.

Diferente da subpopulação IFM, todos os grupos estudados apresentaram mesma resistência ao cálcio, demonstrado pela concentração semelhante de Ca^{2+} extramitocondrial a cada adição próton (Figura 31).

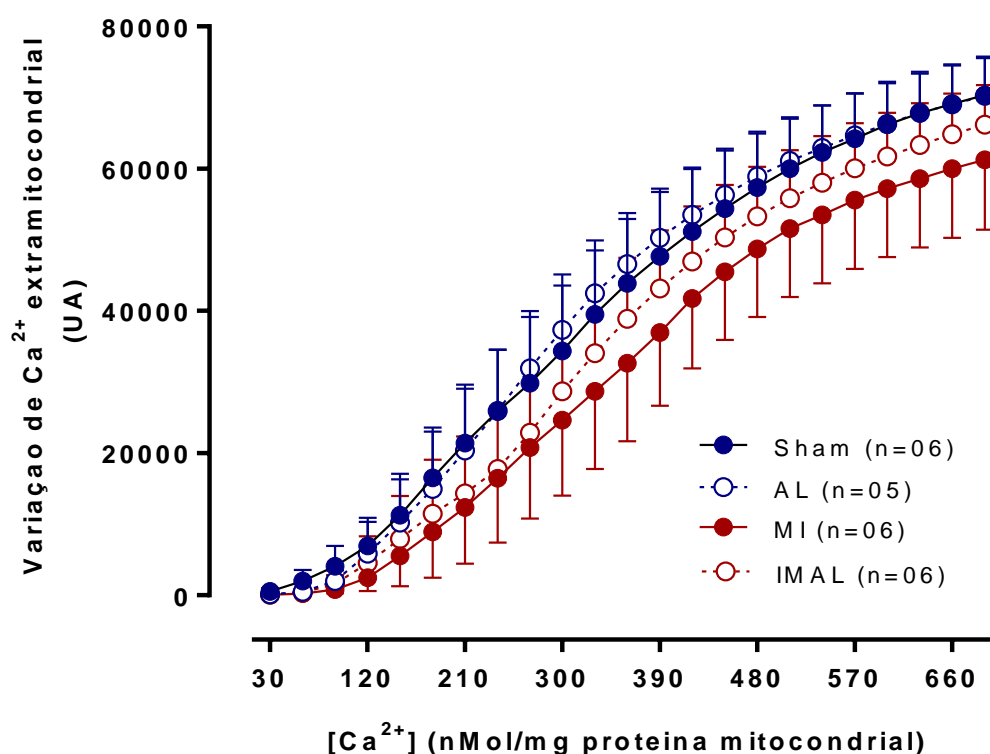


Figura 31 - Captação de cálcio e probabilidade de abertura do poro mitocondrial da fração subsarcolemal (SSM) de ratos Sham, IM, AL e IMAL. ANOVA duas vias seguida de pos-hoc de Fisher. O número de animais está indicado entre parênteses.

Mais uma vez avaliamos a resistência ao cálcio da mitocôndria isolada (*Swelling*) e como encontrado na subpopulação IFM todos os grupos apresentaram redução da absorbância, no entanto, apenas os grupos IM e IMAL apresentaram uma diminuição o estatisticamente significativa em relação

ao grupo Sham tanto com 100 nM quanto de 500 nM de Ca^{2+} (Ca 100nM em 1200s: Sham $0,72 \pm 0,02$; IM $0,77 \pm 0,01^*$; IMAL $0,77 \pm 0,02^*$. Ca 500nM em 1200s: Sham $0,69 \pm 0,02$; IM $0,77 \pm 0,01^*$; IMAL $0,77 \pm 0,01^*$; $*p < 0,05$). (figura 32 A e B).

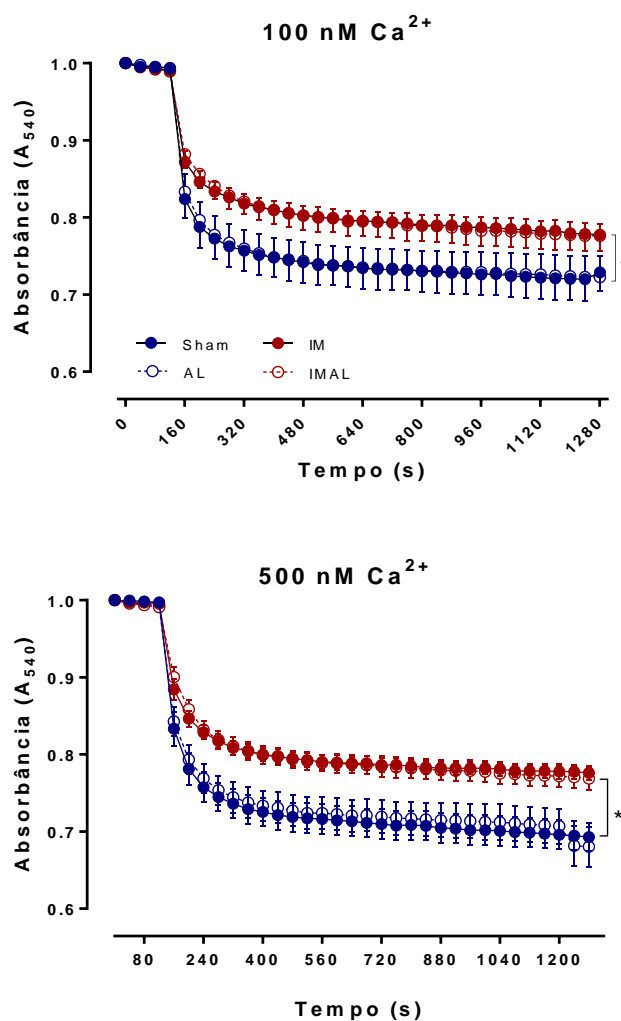


Figura 32 - Análise da resistência ao cálcio (*Swelling*). Queda da absorbância após adição de cálcio na concentração final de 100 e 500 nM por μg de proteína na subpopulação subsarcolemal (SSM) de ratos Sham, IM, AL e IMAL. ANOVA duas vias seguida de pos-hoc de Fisher. $*p < 0,05$ vs Sham. 6 a 8 animais por grupo.

4.6 Atividade das enzimas envolvidas na dinâmica mitocondrial na disfunção cardíaca e no tratamento com ácido linoleico por 15 dias

A expressão proteica do canal uniporter (MCU) nas duas subpopulações mitocondrial está representada abaixo. Podemos observar que no grupo IM houve uma diminuição estatisticamente significativa em relação ao grupo Sham na subpopulação IFM (Figura 33A) e que o ácido linoleico não foi capaz de alterar esse achado (Sham $0,9 \pm 0,08$; IM $0,55 \pm 0,06^*$; IMAL $0,90 \pm 0,11$; $*p < 0,05$). Em relação a subpopulação SSM (Figura 33B), nenhuma alteração foi observada entre os grupos estudados.

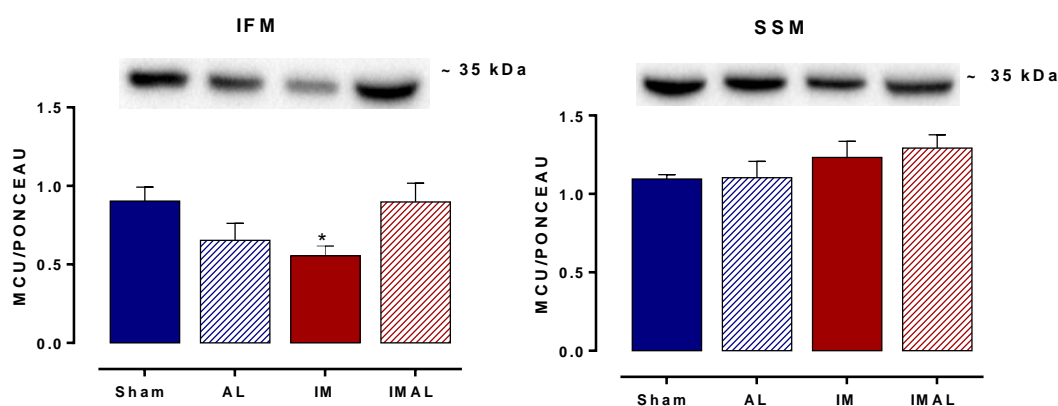


Figura 33 - Expressão proteica do canal de cálcio uniporter (MCU) em mitocôndrias isoladas do ventrículo esquerdo dos grupos Sham, AL, IM e IMAL nas subpopulações intermiofibrilar (IFM) e subsarcolemal (SSM). Resultados expressos como média \pm EPM. ANOVA duas vias seguida de pos-hoc de Fisher. $*p < 0,05$ vs Sham. 5-7 animais por grupo.

Ao analisarmos a expressão proteica da ciclofilina D em mitocôndria isolada de ventrículo esquerdo de animais submetidos a cirurgia de infarto e tratamento com ácido linoleico por 15 dias, observamos que houve aumento no grupo IM na subpopulação IFM e que o ácido linoleico (IMAL) foi capaz de manter sua expressão em relação ao Sham (Sham $0,64 \pm 0,1$; IM $0,1,58 \pm 0,07^*$; IMAL $0,85 \pm 0,1$; $*p < 0,05$) (Figura 34A). No entanto, essa alteração não foi observada em relação a subpopulação SSM entre os grupos estudados (Figura 34B).

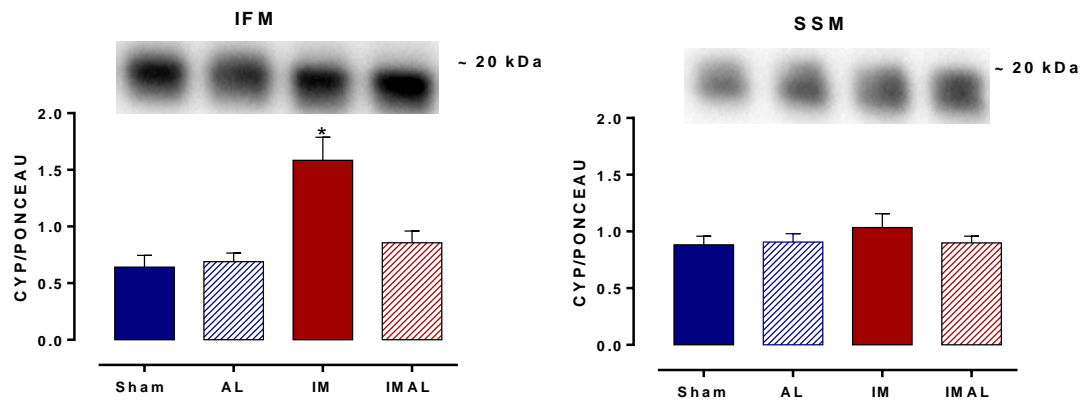


Figura 34 - Níveis proteicos de mitocôndria isolada de ventrículo esquerdo dos grupos Sham, AL, IM e IMAL na análise de densitometria pela técnica de Western Blot de Ciclofilina D nas subpopulações intermiofibrilar (IFM) e subsarcolemal (SSM). Resultados expressos em média \pm EPM. ANOVA duas vias seguida de pos-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ vs Sham. Número de animais é indicado entre parêntesis. 5 a 8 animais por grupo.

5. DISCUSSÃO

Na primeira parte do presente estudo utilizamos 3 diferentes doses do ácido linoleico (5 mg/Kg, 15 mg/Kg e 50 mg/Kg) em animais saudáveis para avaliar seus efeitos sobre a mecânica cardíaca e função mitocondrial. Observamos aumento da contratilidade miocárdica e melhora da função mitocondrial, no grupo AL50 quando comparado ao Sham. Esses resultados corroboram os dados publicados por Mitchel et al (2002), os quais descreveram efeito inotrópico positivo sobre corações isolados perfundidos com uma concentração semelhante a dose de AL usada no presente estudo (30 μ M).

O AL também melhorou a oxidação fosforilativa e aumentou a capacidade das mitocôndrias em reter cálcio em animais saudáveis após 15 dias de tratamento mais notadamente no grupo AL50, discordando da literatura que sugere disfunção mitocondrial em concentrações entre 25 e 50 μ M de AL *in vitro* (Mitchel, Moran e Grant, 2002).

Com base nos resultados encontrados em animais saudáveis caracterizamos os efeitos de 50mg/Kg de AL na estrutura e função das duas subpopulações mitocondriais cardíacas, SSM e IFM, após infarto do miocárdio em ratos. Sabendo que a mitocôndria é peça fundamental na manutenção da viabilidade e funcionalidade do cardiomiócito, analisamos a função e a dinâmica da organela no coração para entender as alterações celulares decorrentes do infarto do miocárdio.

Os principais resultados deste estudo demonstram disfunção mitocondrial cardíaca associada ao infarto do miocárdio, que, possivelmente contribuíram para o agravamento da disfunção ventricular. O tratamento com AL mostrou-se eficaz em minimizar os efeitos deletérios sofridos pela mitocôndria após a cirurgia de infarto do miocárdio, além de restaurar a função contrátil ventricular.

O AL é um ácido graxo que, convertido em acil-CoA, fica disponível para os passos iniciais na síntese de fosfolípidos e para entrar na matriz mitocondrial, onde ocorre remodelação de cardiolipina (Coleman et al, 2015). A cardiolipina (CL) é um fosfolípido mitocondrial composto por 80-90% de AL e que contribui para muitos aspectos da função mitocondrial, incluindo a produção de energia através da fosforilação oxidativa, fissão e fusão

mitocondrial além de participarem na apoptose celular (Coleman et al, 2015, Chicco et al, 2007).

5.1 Caracterização do modelo de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio: efeito do ácido linoleico

A cirurgia de indução do infarto do miocárdio em animais é utilizada para mimetizar o quadro de disfunção ventricular e IC observado em humanos (Pfeffer et al, 1979; Ferreira et al, 2012). No presente estudo avaliamos a função cardíaca de ratos após 15 dias do IM tratados ou não com AL.

Utilizamos para este estudo, animais com área de infarto entre 30 e 50 % da parede do VE. Nossos achados mostram que ambos os grupos submetidos à cirurgia de infarto apresentaram quase 40 % de área de infarto, medidos pela planimetria em papel milimetrado, um método reprodutível e de baixo custo (Mill et al, 1990, Stefanon et al, 2009, Faria et al, 2011).

Como consequência da perda exacerbada de tecido contrátil cardíaco, decorrente do processo isquêmico, esperávamos que os animais submetidos à cirurgia de infarto desenvolvessem disfunção contrátil ventricular esquerda, conforme descrito anteriormente por Stefanon et al. (1998). A perda da função cardíaca observada no grupo IM corrobora os achados da literatura e o principal achado deste estudo é que o tratamento com AL por 15 dias foi capaz de impedir essa disfunção ventricular decorrente do infarto e manter a contratilidade miocárdica em valores semelhante aos do grupo Sham não tratado com AL.

A melhora do desempenho contrátil ventricular ocorreu em resposta, tanto ao aumento de pré-carga, quanto em função da elevação das concentrações de cálcio na solução de perfusão.

Essa disfunção contrátil cardíaca ocorre como consequência da lesão do miocárdio e da hiperatividade dos sistemas neuro-humorais, que promovem hipertrofia ventricular e aumento na deposição de colágeno ao longo do tempo (Brum et al., 2006). De fato, observamos remodelamento cardíaco patológico nos animais com IM, representado pelo aumento do volume nuclear e da deposição de colágeno. O remodelamento também pode ser a causa para o aumento na relação PP/PC encontrada nos animais submetidos ao IM.

Segundo Jasmim et al (2013), após infarto foi identificado importante remodelamento estrutural dos pulmões evidenciado pela deposição de colágeno, espessamento dos septos alveolares e proliferação de miofibroblastos, com pequena evidência de edema pulmonar, como sugeria Figueroa & Peters (2006) em consequência da incapacidade do ventrículo esquerdo em bombear quantidades adequadas de sangue.

As alterações morfofuncionais cardíacas decorrentes do IM também desencadeiam modificações hemodinâmicas (Colucci, 1998). No que concerne às medidas pressóricas “in vivo” observamos que o IM promoveu diminuição dos valores de PAS, PAD e PSVE porém, não observamos diferenças associadas ao tratamento com AL nesses parâmetros quando comparados ao grupo Sham.

Em conjunto esses últimos achados (VD/PC, PP/PC, PAS, PSVE) sugerem que em nosso modelo experimental os animais eram infartados mas não apresentaram os sinais clássicos de insuficiência cardíaca como aumento das razões PP/PC e VD/PC de pelo menos 2 vezes em relação ao Sham (Davidoff et al, 2004, Francis et al, 2001, Pereira et al 2005). Além disso, de acordo com Faria et al. (2011) ratas fêmeas infartadas e insuficientes sofrem perda ponderal significativa ao longo do período pós-operatório. No presente estudo utilizamos animais machos e, tanto os do grupo Sham e do grupo IM, independente do tratamento com AL apresentaram o mesmo ganho ponderal ao final dos 15 dias.

Para avaliar os mecanismos envolvidos na via de sinalização do cálcio que resultaram na melhora da contratilidade induzida pelo tratamento com AL, avaliamos as expressões proteicas da SERCA2a e PLB. O transporte de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático cardíaco apresenta papel chave sobre o acoplamento excitação contração, onde a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático induz a contração e sua recaptção pela SERCA2a (Bers, 2002). Neste estudo, a expressão da SERCA2a não foi alterada 15 dias após IM, muito embora a contratilidade miocárdica estivesse reduzida. Este fato poderia ser explicado pelos achados de Hasenfuss et al (1994) que descreveram uma correlação entre força contrátil e níveis de SERCA2a apenas no período final de uma insuficiência cardíaca congestiva. Assim, parece que a disfunção mecânica decorrente do IM não foi uma consequência direta de

modificação na expressão da SERCA2a, embora sua atividade pudesse estar prejudicada, como mostra Hayward et al (2015) que sugere terapia genética para tratamento do infarto. Entretanto, o tratamento com AL, aumentou a expressão da SERCA2a em relação ao grupo Sham, o que poderia contribuir para a melhora da contratilidade induzida pelo AL após IM. Por outro lado, a expressão proteica da SERCA2a não foi modificada pelo tratamento com AL no grupo Sham, apesar do efeito inotrópico positivo frente ao aumento de Ca^{2+} extracelular e ao estiramento. Portanto, é possível que o AL tenha envolvido outros mecanismos, que não apenas dependente da expressão proteica da SERCA2a, para aumentar a contratilidade miocárdica, tanto no grupo Sham quanto no grupo infartado.

Como a demanda energética do coração é alta, a manutenção do AEC depende da produção contínua de ATP pela mitocôndria é importante para a contratilidade miocárdica. Como a produção de ATP envolve as etapas de glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa, prejuízo na transferência de elétrons, poderiam contribuir para a falha neste sistema e para a geração de EROs,

Sabendo-se que o aumento da concentração de cálcio intracelular induz aumento da contratilidade miocárdica com consequente ativação da fosfatase dependente de cálcio, e, que essa enzima controla a expressão de PGC1 α no músculo, analisamos também a expressão proteica de PGC1 α , do NRF1 e do PPAR α fatores de transcrição ou receptores nucleares por ele ativados. Os animais infartados que receberam tratamento com ácido linoleico por 15 dias (IMAL) apresentaram aumento do PGC1 α em relação ao animal Sham. Estudando cultura de células com streptozotocina, Jeng et al (2009), relataram que o tratamento com 100 μL de AL também aumentou PGC1 α .

A expressão proteica do NRF-1, aumentou no grupo IM em relação ao animal Sham mas não foi diferente no grupo IM tratado com ácido linoleico. Ao analisar o PPAR α observamos que o infarto do miocárdio não foi capaz de alterar sua expressão proteica, no entanto, houve redução no grupo Sham tratado com ácido linoleico.

Em conjunto esses dados demonstram que o tratamento com AL foi capaz de melhorar a contratilidade miocárdica em animais Sham e prevenir a

disfunção contrátil de animais infartados sem alterar dados ponderais, morfométricos e hemodinâmicos, mas influenciando no metabolismo mitocondrial. Portanto, existe uma relação fundamental entre função mitocondrial e contratilidade miocárdica.

A ação do AL sobre a função cardíaca vem sendo mostrada na literatura. Pietri et al (1991), relatam o efeito cardioprotetor de ácidos graxos poli-insaturados sobre a mecânica cardíaca e a resposta metabólicas de animais submetidos a isquemia-reperfusão, Kang et al (1994), relatam o efeito antiarrítmico dos PUFAS em miócitos cardíacos de ratos neonatos e Mitchell et al (2002), mostraram o efeito inotrópico positivo em corações isolados. Nasa et al. (1997) demonstraram que após 12 semanas do infarto do miocárdio havia uma diminuição da concentração de ácido linoleico no miocárdio remanescente. Estudos realizados por Lesnefsky et al.(2004), usando métodos de isquemia em coração isolado de coelho, indicaram que havia perda de 20 a 25 % na concentração de cardiolipina miocárdica após a isquemia. Em outro estudo, Heather et al. (2010) demonstraram baixos níveis de cardiolipina e Citocromo c em corações insuficientes de ratos submetidos ao infarto do miocárdio por ligadura da artéria coronária descendente anterior.

O AL é o principal constituinte da cardiolipina mitocondrial cardíaca sendo fundamental para um ótimo funcionamento da mitocôndria em função de: (1) ativar os complexos da cadeia respiratória e translocase ADP-ATP, produzindo ATP e espécies reativas de oxigênio (ROS); (2) ancorar o citocromo c na membrana da mitocôndria, o que está associado ao processo de morte celular; (3) manter a fluidez da membrana interna e a sua estabilidade osmótica, associado a abertura do poro de permeabilidade mitocondrial; (4) regular a mitofusão associado a biogênese mitocondrial, a deficiência de cardiolipina ou um remodelamento impróprio da mesma, leva a uma disfunção mitocondrial (Han & He, 2014).

5.2 Caracterização da função mitocondrial cardíaca em modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio

A alteração sofrida pela mitocôndria cardíaca é um ponto crucial para a pesquisa focada no tratamento da morbidade e mortalidade resultante de uma

grande quantidade de doenças cardiovasculares. A oclusão cirúrgica da artéria coronária descendente anterior interrompeu o suprimento metabólico para o miocárdio, o fornecimento de oxigênio e de substratos, bloqueando a síntese mitocondrial de ATP, afetando a integridade do potencial de membrana mitocondrial. A menor relação $[ATP] / [ADP]$ abole a inibição ATP alostérica da citocromo c oxidase (Arnold e Kadenbach, 1999), resultando em aumento do potencial de membrana mitocondrial. Nossos dados corroboram essa idéia, mostrando elevação no potencial de membrana nos ratos IM.

Sob hipoxia, pequena quantidade de EROS é produzida no complexo III, que atua como agentes de sinalização e gatilho para diversas respostas funcionais, incluindo o acúmulo do fator de transcrição HIF-1 α (Chandel et al., 2000; Guzy e Schumacker, 2006), responsável pela troca de utilização de substratos (Rey e Semenza, 2010).

Estudos clínicos e experimentais demonstram que existe uma mudança na utilização de substratos pelo coração em falência, que acabam por levar o coração a um déficit energético (Sharov et al., 1998; Rosca et al., 2008; Doenst et al., 2010). Corroborando a literatura, nosso estudo observou uma diminuição da respiração mitocondrial tanto no estado 3 quando no estado 4, quando o ácido graxo palmitoil+carnitina foi utilizado como substrato. Heather et al (2010), correlacionaram essa diminuição da respiração com o substrato palmitoil+carnitina a um prejuízo na fração de ejeção *in vivo* de animais com disfunção cardíaca, mostrando uma relação entre função mitocondrial e função cardíaca. No presente estudo, os animais submetidos a cirurgia de infarto do miocárdio, além de apresentarem diminuição da respiração mitocondrial também apresentaram diminuição do inotropismo positivo quando o coração foi avaliado através da técnica de Langendorff.

Na avaliação da respiração mitocondrial, utilizamos os substratos glutamato e piruvato, que agem diretamente no ciclo de Krebs. Com o uso do glutamato como substrato, podemos analisar o segundo período do ciclo de Krebs, composto de α -cetoglutarato desidrogenase e a subsequente entrada de NADH no complexo I da CTE. Em ratos infartados, corroborando a literatura (Heather et al, 2010; Clarke et al, 2012), o estado 3 e 4 da respiração mitocondrial estão diminuídos, mostrando que a disfunção mitocondrial continua mesmo quando pulamos a primeira etapa do ciclo de Krebs. O piruvato, outro

importante substrato para o ciclo de Krebs, é um produto da glicólise que também irá atuar no complexo I da CTE produzindo NADH que é fundamental para a adequação do suprimento de energia à demanda durante o aumento da carga de trabalho (Liu & Hajnoczky, 2009), por doar elétron a este complexo. Nossos dados mostram que em animais infartados a respiração mitocondrial utilizando piruvato como substrato está reduzida em aproximadamente 50 % em relação ao Sham, mostrando que ocorre diminuição da produção de NADH que leva a comprometimento da função cardíaca.

Uma vez avaliado o impacto do infarto do miocárdio sobre a respiração mitocondrial considerando os substratos utilizados diretamente no ciclo de Krebs e indiretamente no complexo I e seus efeitos na mecânica cardíaca seguimos o estudo utilizando substrato que age diretamente no complexo II, o succinato. A rotenona foi utilizada para inibir o complexo I, pois é sabido que grandes quantidades de succinato são capazes de reduzir ubiquinona e levar elétron para o complexo I através do fluxo reverso (RET) (Hernansanz-Agustín et al, 2017). Em nosso trabalho, encontramos diminuição do estado 3 para o grupo IM em relação ao Sham, que pode ser resultado de uma redução na atividade da citocromo C oxidase o qual é regulado pelo AL.

A diminuição na eficiência respiratória mitocondrial cardíaca nas doenças cardiovasculares vem sendo demonstrada em estudos clínicos e experimentais, os quais apontam redução na atividade dos complexos da CTE como um fator determinante para o prejuízo na transferência de energia para a contração cardíaca e a consequente progressão da disfunção ventricular (Sharov et al., 1998; Nojiri et al., 2006; Rosca, Hoppel, 2009). No entanto, encontramos no presente estudo diminuição na expressão dos complexos III, IV e V apenas na subpopulação IFM.

Hoppel et al (1982), sugerem que a disfunção observada na IFM pode estar relacionada a alterações nas propriedades de transporte de membrana interna mitocondrial envolvidas com nucleotídeos de adenina e/ou síntese de ATP. Como a tensão do oxigênio no centro da célula é muito menor do que na periferia celular (Takasashi et al, 1998) e a hipertrofia cardíaca potencialmente aumentaria a distância para difusão de oxigênio e metabolitos, as condições hipertróficas são mais propensas a impactar negativamente o IFM em relação ao SSM.

Entretanto, é importante destacar que a eficiência da fosforilação oxidativa mitocondrial não depende, exclusivamente, da atividade individual dos complexos respiratórios, mas também do arranjo apropriado entre os componentes da CTE (Rosca et al., 2008; Hausnloy, Ruiz-Meana, 2010). Estudos realizados por Lesnefsky et al. (2004), usando métodos de isquemia em coração isolado de coelho, indicaram que havia perda de 20 a 25 % na concentração de cardiolipina miocárdica após a isquemia. A cardiolipina é responsável pela manutenção do gradiente eletroquímico de prótons hidrogênio em direção ao interior da mitocôndria utilizada pela ATP sintase para catalisar a síntese de ADP + fosfato em ATP. Sem a cardiolipina todo o processo de acoplamento quimiosmótico fica prejudicado (Chicco et al, 2007). O que explicaria nossos achados de diminuição no fornecimento de ATP, sendo esse déficit energético um fator relevante na disfunção contrátil ventricular encontrada após o infarto.

A participação da cardiolipina na modulação das proteínas da cadeia respiratória já foi demonstrada. Fry et al. (1981) descreveram que os complexos I e III da cadeia respiratória só tinham atividade enzimática na presença de cardiolipina. Em outro estudo, Robinson et al. (1990) concluíram que o complexo IV dessa mesma cadeia necessita de duas moléculas de cardiolipina associadas para manter sua função enzimática. Em mitocôndrias isoladas de corações submetidos a isquemia/reperfusão e que tinham deficiência no funcionamento da cadeia respiratória, Hoffman et al. (1994) mostraram que a funcionalidade da cadeia foi restaurada pelo tratamento com cardiolipina.

Além de participar na função da CTE, a cardiolipina também é importante na fixação do citocromo C na membrana interna da mitocôndria (Chicco et al, 2007). Heather et al. (2010) demonstraram baixos níveis de citocromo c em corações insuficientes de ratos submetidos ao infarto do miocárdio por ligadura da artéria coronária descendente anterior. A perda de cardiolipina leva diretamente a perda da interação do citocromo c e da atividade do complexo III, prejudicando a respiração e aumentando a geração de ROS ainda mais no coração infartado (Lesnefsky et al, 2003; Paradies et al, 2003; Lesnefsky et al, 2004).

No presente estudo encontramos diminuição da expressão do complexo III, no entanto, não encontramos alteração nos complexos I e II, demonstrando que o transporte de elétrons na parte inicial da CTE está idêntica a do Sham.

Entretanto, é sabido que os elétrons transportados pela CTE nem sempre chegam ao seuceptor final, o O_2 complexado à citocromo c oxidase (complexo IV), pois entre os complexos I e III há o extravasamento de elétrons com consequente formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e que isto ocorre com o aumento do consumo de O_2 , e/ou com aumento no fluxo de elétrons pela CTE (Sen, 1995), e/ou aumento no potencial de membrana interna mitocondrial (Skulachev, 1998).

De fato, Friguet, Bulteau e Petropoulos (2008) demonstraram que a produção exacerbada de EROs pode inativar diretamente proteínas mitocondriais ou contribuir para a oxidação de lipídeos e carboidratos, gerando uma disfunção mitocondrial. A disfunção mitocondrial na presença de O_2 resulta, na maioria das vezes, no desacoplamento da CTE e no consequente prejuízo da fosforilação oxidativa, gerando EROs em excesso. Essas alterações na homeostase redox sinalizam para o dano miocárdico e culminam na diminuição progressiva da contratilidade cardíaca encontrada no presente estudo.

Na tentativa de proteger as células do estresse oxidativo e para prevenir a apoptose/morte celular, mecanismos adaptativos induzem o aumento do fator nuclear respiratório (NRF-1) e *up-regulation* de seu co-ativador, PGC-1 α e indiretamente regulam o genoma mitocondrial por *up regulation* do fator de transcrição mitocondrial (Tfam) que transloca para dentro da mitocôndria e ativa diretamente a transcrição e a replicação de mtDNA (Bartz *et al*, 2015). Em conjunto, esses mecanismos são altamente cardio-protetores sendo capazes de estimular a biogênese mitocondrial, a β -oxidação de ácidos graxos, aumentar a capacidade enzimática do ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa (OXPHOS) (St-Pierre *et al*, 2003; Wu *et al*, 1999) além de preservar a viabilidade dos cardiomiócitos limitando a ativação da apoptose intrínseca e prevenção do déficit de energia e necrose. Além disso, PGC-1 α estimula a expressão de proteínas desacopladoras da membrana (Puigserver *et al*, 2001; St-Pierre *et al*, 2003; Wu *et al*, 1999), o que dissipa o gradiente de prótons na tentativa de diminuir o potencial de membrana mitocondrial, um processo em

que acredita-se reduzir altamente a produção de EROs pelas mitocôndrias (Miwa S, Brand MD, 2003). Observamos aumento de NRF-1 em animais infartados, corroborando a literatura que mecanismos compensatórios estão tentando manter a função mitocondrial intacta.

Um achado do presente estudo é que a subpopulação IFM de animais infartados apresentou maior capacidade de retenção de cálcio em comparação ao Sham e que a subpopulação SSM não apresentou o mesmo efeito. Segundo a literatura, a proximidade da IFM aos locais conhecidos de liberação de cálcio, a junção do retículo sarcoplasmático (localizado entre IFM e Tubulo-T) faz com que essa subpopulação tenha um envolvimento central no processo do ciclo mitocondrial de cálcio (Shepherd et al, 2014). Além disso as mitocôndrias subsarcolemais têm uma capacidade diminuída para acumular cálcio em comparação com IFM. E ainda, esse cálcio acumulado tem papéis diferentes, sendo o cálcio no SSM responsável pela liberação do citocromo c, enquanto o cálcio no IFM não resulta nessa liberação, nem mesmo quando a capacidade de IFM para reter cálcio foi excedida (Hoppel et al, 2001).

Balaban et al, (2000), descreveram que o cálcio mitocondrial desempenha um papel fundamental na regulação do metabolismo da energia celular, no acoplamento excitação-contração cardíaca e na geração de ATP para contração. Na matriz mitocondrial, o Ca^{2+} desempenha um papel importante na sua energética, pela ativação da F1/FO-ATPase e pela regulação do OXPHOS por ativar desidrogenases sensíveis ao Ca^{2+} no ciclo do ácido tricarboxílico, incluindo piruvato desidrogenase, 2-oxoglutarato (α -cetoglutarato) desidrogenase e NAD acoplado ao isocitrato desidrogenase ligada a um ligante (Gellerich et al, 2010). A ativação dessas enzimas no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) resulta em aumento da produção de NADH, que é fundamental para a adequação do suprimento de energia à demanda durante o aumento da carga de trabalho (Liu & Hajnoczky, 2009).

Corroborando a literatura, a análise do *swelling* mostra que os animais infartados foram capazes de reter mais cálcio que os grupos Sham, no entanto, a maior quantidade de cálcio na matriz provavelmente não aumenta a produção de NADH devido à diminuição da atividade da citocromo c oxidase que foi relatado anteriormente em animais infartados.

Importante ressaltar que no tecido cardíaco, um ligeiro aumento na concentração de Ca^{2+} intra mitocondrial é utilizado para ativação da respiração mitocondrial. Porém, durante a isquemia, a concentração de Ca^{2+} nas mitocôndrias eleva-se, como demonstrado em nosso estudo. De fato, a mitocôndria aumenta sua captação funcionando como um sistema tampão em resposta ao aumento do cálcio citosólico, por forma de garantir a estabilidade das concentrações citosólicas de Ca^{2+} . Esse aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} a longo prazo leva a apoptose. Diversos estudos demonstram que a apoptose é precedida por alterações das membranas mitocondriais, levando a perda normal do gradiente eletroquímico, desenvolvimento do fenómeno de transição de permeabilidade mitocondrial, produção de EROs e liberação de fatores apoptóticos (como citocromo c) para o citosol (Providencia et al, 2003).

Dois possíveis mecanismos para a saída do citocromo c do espaço intermembranar mitocondrial são: o fenómeno de transição de permeabilidade mitocondrial com ruptura da membrana externa após o intumescimento das mitocôndrias e o transporte do citocromo c através de poros específicos na membrana externa (BAX e Porinas). Poros esses com natureza exata ainda desconhecida mas podendo incluir o canal aniônico dependente de voltagem, o translocador de nucleótídeos de adenina e a proteína matricial ciclofilina D (Bers et al, 2016).

Após o aumento de cálcio mitocondrial, a ciclofilina D se liga a adenina nucleotídeo translocase e libera o citocromo C. Nossos dados estão de acordo com a literatura por apresentarem aumento na concentração de cálcio intramitocondrial e aumento na ciclofilina D à análise bioquímica. No entanto, este é o primeiro estudo que mostra retenção de cálcio na fase inicial após IM. Além disso, mesmo ao aumento de cálcio mitocondrial e aumento da ciclofilina D, não observamos abertura do poro mitocondrial. Chernyak e Bernardi (1996) estudando mitocôndria de fígado relacionou o aumento de cálcio e geração de EROs a valores mais negativos da membrana (aumento do potencial de membrana), o que impediu a abertura do MPTP.

5.3 Efeitos do ácido linoléico sobre a função mitocondrial cardíaca em modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio

Depois de verificarmos que a disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio é acompanhada de alterações na dinâmica mitocondrial cardíaca, investigamos o efeito do AL nessa variável.

Como visto em nossos resultados, o uso de AL por 15 dias em animais submetidos ao infarto do miocárdio foi capaz de restaurar o consumo máximo de O₂ (estado 3) a níveis observados no grupo Sham para os substratos glutamato+malato, piruvato+malato e palmitoil+carnitina nas duas subpopulação IFM e SSM. Ao analisarmos o estado 4 o restabelecimento da função foi observada apenas nos substratos piruvato+malato e palmitoil+carnitina na IFM, enquanto na SSM apenas no glutamato+malato a função foi restabelecida a valores do Sham.

Chicco et al (2012), após 4 semanas de uma dieta enriquecida com AL também encontraram melhora no estado 3 de coração de ratos espontaneamente hipertensos utilizando piruvato e palmitoil+carnitina como substratos. Esses resultados demonstram que o AL atenua a disfunção respiratória de mitocôndrias cardíacas. Segundo os autores, existe diminuição da citocromo c oxidase associada a diminuição no estado 3 encontrado. A literatura diz que é necessário um perfeito arranjo na sua estrutura molecular L₄CL para que a citocromo c oxidase ocorra perfeitamente (Kito et al, 1991). A L₄CL é mantida pela biodisponibilidade de AL e é o principal constituinte da cardiolipina.

Já mencionamos que a cardiolipina é um fosfolípido mitocondrial que desempenha um papel crítico na manutenção da função mitocondrial e da saúde miocárdica (Chicco & Saragna, 2007). Chicco et al 2012 , mostra que a dieta rica em AL aumenta o conteúdo de cardiolipina mitocondrial em VE, o que pode justificar nossos achados de melhora da função respiratória mitocondrial.

O AL também é responsável pela ancoragem do citocromo c na membrana interna mitocondrial e fornece suporte estrutural e funcional essencial às proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa (Chicco & Saragna, 2007), tendo sua principal atuação no complexo III da CTE. Em nosso estudo observamos que na subpopulação SSM ocorreu a restauração da expressão do complexo III quando os animais infartados foram tratados com AL,

sugerindo que o tratamento foi capaz de manter a estrutura do citocromo c e sua função.

Assumindo que houve uma manutenção do citocromo c, observamos também a restauração do NRF-1, que estava aumentado nos animais infartados. Lembrando que o NRF-1 é superexpresso na presença de EROs e que essas são formadas a partir da perda do citocromo c (Barts et al, 2005), inferimos que o AL foi capaz de diminuir a formação de EROs após infarto do miocárdio.

O AL também restaurou a ciclofinila D a níveis observados no grupo Sham. Como dito anteriormente, a ciclofilina D é um componente chave para regulação do poro de transição mitocondrial e apoptose celular por liberar o citocromo c (Molkentin et al, 2010), além de ajudar na manutenção da função cardíaca. Yellon et al (2011) mostram que após 2 dias da cirurgia a função do ventrículo esquerdo era melhor em ratos *knockout* para ciclofilina e após 28 dias a mortalidade foi reduzida para metade, o tamanho do infarto do miocárdio foi reduzido, a função sistólica do VE foi preservada, a dilatação do VE foi atenuada e no miocárdio não infartado, houve menor hipertrofia de cardiomiócitos e de formação de fibrose intersticial.

No presente estudo observamos o efeito do AL sobre a ciclofilina D em apenas 15 dias pós infarto do miocárdio e observamos melhora na mecânica cardíaca, portanto, sugerimos que o AL se mostra mais uma vez eficaz contra mecanismos que leva a morte celular e na manutenção da função cardíaca.

Também foi observada uma melhora da função no complexo I na subpopulação SSM. Podemos relacionar esse achado a maior capacidade de mitocôndria para oxidar o piruvato, o que reflete numa melhora na utilização de glicose miocárdica, o que pode ter contribuído com a melhora da função VE (Stanley & Chandler, 2002).

Observamos ainda que o coração recuperou sua capacidade em oxidar ácido graxo quando a oxidação do substrato palmitoil+carnitina, no estado 3, de animais infartados que receberam AL foi igual ao grupo Sham.

Um achado do presente estudo é que os animais tratados com AL tiveram maior capacidade de reter cálcio intramitocondrial do que os animais Sham na subpopulação IFM. A subpopulação SSM não apresentou o mesmo efeito. Na matriz mitocondrial, o Ca^{2+} ativa bomba F1/FO-ATPase (Liu &

Hajnoczky, 2009) piruvato desidrogenase 2-oxoglutarato (α -cetoglutarato) desidrogenase e NAD acoplado ao isocitrato desidrogenase ligada a um ligante (Gellerich et al, 2010) que resulta em aumento da produção de NADH, gerando energia necessária à demanda durante o aumento da carga de trabalho e impactando na capacidade antioxidante celular e produção de EROs (Kohlhaas *et al*, 2010)

O mecanismo que permite a entrada do cálcio na membrana mitocondrial interna é o aumento da negatividade do potencial de membrana (-180 mV) que gera força motriz suficiente para a entrada de cálcio na matriz a partir do citosol (Boyman et al, 2014). Como encontramos que o potencial de membrana é maior no grupo IMAL na subpopulação SSM, este maior potencial de membrana pode ser o responsável pela entrada de cálcio. Além disso, a maior quantidade de cálcio na matriz provavelmente aumenta a produção de NADH devido a manutenção da atividade da citocromo C oxidase que foi relatado na literatura (Chicco et al, 2007).

Apenas a subpopulação IFM do grupo IMAL apresentou menor sensibilidade ao Ca^{2+} induzindo a probabilidade de abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (MPTP) em comparação com os outros grupos estudados. A resistência a abertura do MPTP neste grupo, poderia ser atribuída a redução na geração de EROs. Constantini et al (1996), relatam redução na glutathiona mitocondrial e menor modulação da nucleotídeo piridina (NADH/NAD + NADPH/NADP), reduzem o estado oxidativo da mitocôndria e leva a uma redução da probabilidade de abertura de mitocondrial.

A sinalização do cálcio mitocondrial contribui para a regulação do metabolismo energético celular, acoplamento excitação-contração cardíaca e geração de ATP para a contração dos miócitos.

No entanto, não foi observado aumento na expressão do MCU que justique a maior entrada de Ca^{2+} na mitocôndria. Embora o MCU talvez seja o mais importante canal para passagem do íon, em níveis fisiológicos, o modo rápido de captação de Ca^{2+} (RaM) são mais eficientes na sua absorção e centenas de vezes mais rápido do que a MCU (Bazil e Dash, 2011).

Além disso, a entrada de cálcio na mitocôndria também pode ocorrer pela sua proximidade com o RS, onde no seu ponto de contato o Ca^{2+} é

diretamente transferido para mitocôndria, estimulando o ciclo de Krebs e a produção de ATP (Cardenas et al, 2010).

Em conjunto esses dados demonstram que o tratamento com AL foi capaz de melhorar a contratilidade miocárdica em animais Sham e prevenir a disfunção contrátil de animais infartados sem alterar dados ponderais, morfométricos e hemodinâmicos, mas influenciando no metabolismo mitocondrial de maneira diferenciada nas subpopulações mitocôndrias SSM e IFM.

6. CONCLUSÃO

Concluimos com o presente estudo que o tratamento com ácido linoleico na dose de 50 mg/kg por 15 dias após o infarto do miocárdio está relacionado à melhora do metabolismo mitocondrial e da contratilidade miocárdica. Nossos resultados sugerem um possível efeito cardioprotetor do ácido linoleico agindo sobre: o *stress oxidativo*, devido a redução da expressão protéica de NRF-1; aumento da expressão proteica da SERCA2a; maior capacidade de retenção ao Ca^{2+} para as subpopulações mitocondriais subsarcolemas (SSM) e interfibrilares (IFM) tanto na expressão dos complexos quanto da fosforilação oxidativa. Em conjunto, estes efeitos poderiam explicar, pelo menos em parte, a melhora da contratilidade induzida pelo tratamento com AL após infarto do miocárdio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahuja M, Muallem S. The gatekeepers of mitochondrial calcium influx: MICU1 and MICU2. **EMBO Rep.** 15 (3):205-20, 2014.

Alberts, A. Biologia molecular da célula. Tradução Ana Beatriz Gorine et al. 4a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

Arnold S, Kadenbach, B. The intramitochondrial ATP/ADP-ratio controls cytochrome c oxidase activity allosterically. **FEBS Lett.** 443 (2): 105–108, 1999.

American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics – 2012 Update. Dallas, TX: American Heart Association; 2012.

Aubert G, Vega RB, Kelly DP. Perturbations in the gene regulatory pathways controlling mitochondrial energy production in the failing heart. **Biochim Biophys Acta.** 1833 (4): 840–847, 2013.

Aubert G, Martin OJ, Horton JL, Lai L, Vega RB, Leone TC, Koves T, Gardell SJ, Krüger M, Hoppel CL, Lewandowski ED, Crawford PA, Muoio DM, Kelly DP. The Failing Heart Relies on Ketone Bodies as a Fuel. **Circulation.** 133(8): 698–705, 2016.

Baldo MP, Davel AP, Nicoletti-Carvalho JE, Bordin S, Rossoni LV, Mill JG. Granulocyte colony-stimulating factor reduces mortality by suppressing ventricular arrhythmias in acute phase of myocardial infarction in rats. **J Cardiovasc Pharmacol.** 52(4):375-80, 2008.

Bartz RR, Suliman HB, Piantadosi CA. Redox mechanisms of cardiomyocyte mitochondrial protection. **Frontiers in Physiology.** 6 (6): 291, 2015.

Bauersachs J, Widder JD. Endothelial dysfunction in heart failure. **Pharmac Rep.** 60 (1):119-126, 2008.

Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL, Koteliensky V & Mootha VK. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. **Nature.** 476:341-345, 2011.

Bayeva M, Gheorghiade M, Ardehali H. Mitochondria as a therapeutic target in heart failure. **J. Am. Coll. Cardiol.** 61 (6):599–610, 2014.

Bazil JN, Dash RK. A minimal model for the mitochondrial rapid mode of Ca^{2+} uptake mechanism. **PloS one.** 6(6):e21324, 2011.

Beer M, Seyfarth T, Sandstede J, Landschütz W, Lipke C, Köstler H, von Kienlin M, Harre K, Hahn D, Neubauer S. Absolute concentrations of high-energy phosphate metabolites in normal, hypertrophied, and failing human myocardium measured noninvasively with (^{31}P) -SLOOP magnetic resonance spectroscopy. **Journal of the American College of Cardiology.** 40(7):1267-1274, 2002.

Bereiter-Hahn J, Voth M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. **Microscopy Research and Technique.** 27(3): 198-219, 1994.

Bereiter-Hahn J. Behavior of mitochondria in the living cell. **International Review of Cytology.** 122: 1-63, 1990.

Berquin IM, Edwards I, Chen YQ. Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. **Cancer Lett.** 269(2):363–377, 2008.

Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. **Annu Rev Physiol.** 70:23–49, 2008.

Bers DM. Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction. **Annu Rev Physiol.** 76: 107-27, 2014.

Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. **Physiol. Rev.** 79 (3), 763–854, 1999.

Bocchi EA, Marcondes-Braga FG, Bacal F, Ferraz AS, Albuquerque D, Rodrigues Dde A, Mesquita ET, Vilas-Boas F, Cruz F, Ramires F, Villacorta H Jr, Souza Neto JD, Rossi Neto JM, Moura LZ, Beck-da-Silva L, Moreira LF, Rohde LE, Montera MW, Simoes MV, Moreira Mda C, Clausell N, Bestetti R, Mourilhe-Rocha R, Mangini S, Rassi S, Ayub-Ferreira SM, Martins SM, Bordignon S, Issa VS. Updating of the Brazilian guideline for chronic heart failure - 2012. **Arq Bras Cardiol.** 98 (1-suppl 1):1-33, 2012.

Boyman L, Chikando AC, Williams GS, Khairallah RJ, Kettlewell S, Ward CW, Smith GL, Kao JP, Lederer WJ. Calcium movement in cardiac mitochondria. **Biophysical journal:** 107(6):1289-301, 2014.

Brant LC, Nascimento BR, Passos VMA, Duncan BB, Bensenõr IJM, Malta DC, Souza MFM, Ishitani LH, França E, Oliveira MS, Mooney M, Naghavi M, Roth G, Ribeiro ALP. Variações e diferenciais da mortalidade por doença cardiovascular no Brasil e em seus estados, em 1990 e 2015: estimativas do Estudo Carga Global de Doença. **Rev Bras Epidemiol.** 20 (1): 116-128, 2017.

Braunwald E. Heart Failure. **JACC Heart Fail.** 1:1-20, 2013.

Brown DA, Perry JB, Allen ME, Sabbah HN, Stauffer BL, Shaikh SR, Cleland JG, Colucci WS, Butler J, Voors AA, Anker SD, Pitt B, Pieske B, Filippatos G, Greene SJ, Gheorghiade M. Mitochondrial function as a

therapeutic target in heart failure. **Nature review cardiovascular** 14(4):238-250, 2017.

Brum PC, Rolim NP, Bacurau AV, Medeiros A. Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 78(3):485-503, 2006.

Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free radical biology & medicine**. 29(3-4):222-230, 2000.

Campos JC. **Caracterização da função e da dinâmica mitocondrial em modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio: efeitos do treinamento físico aeróbico**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Carafoli E, Tiozzo R, Lugli G, Croveti F, Kratzing C. The release of calcium from heart mitochondria by sodium. **Journal of molecular and cellular cardiology**. 6(4):361-371, 1974.

Cárdenas C, Miller RA, Smith I, Bui T, Molgó J, Müller M, Vais H, Cheung KH, Yang J, Parker I, Thompson CB, Birnbaum MJ, Hallows KR, Foscett JK. Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca^{2+} transfer to mitochondria. **Cell** 142 (2):270–283, 2010.

Carley AN, Taegtmeyer H, Lewandowski ED. Matrix revisited: mechanisms linking energy substrate metabolism to the function of the heart. **Circ Res** 114 (4):717–729, 2014.

Carlucci A, Lignitto L, Feliciello, A. Control of mitochondria dynamics and oxidative metabolism by cAMP, AKAPs and the proteasome. **Trends in Cell Biology**. 18(12): 604-613, 2008.

Carraro M, Giorgio V, Šileikytė J, Sartori G, Forte M, Lippe G, Zoratti M, Szabò I, Bernardi P. Channel formation by yeast F-ATP synthase and the role of dimerization in the mitochondrial permeability transition. **J. Biol. Chem.** 289 (23):15980–15985, 2014.

Catherine Garrel, Jean-Mar Alessandri, Philippe Guesnet, Kais H. Al-Gubory. Omega-3 fatty acids enhance mitochondrial superoxide dismutase activity in rat organs during post-natal development. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.** 44 (1):123–131 2012.

Catherine H. Le,; Christopher M. Mulligan; Melissa A. Routh; Gerrit J. Bouma; Melinda A. Frye; Kimberly M. Jeckel; Genevieve C. Sparagna; Joshua M. Lynch; Russell L. Moore; Sylvia A. McCune; Michael Bristow MD; Simona Zarini; Robert C. Murphy; Adam J. Chicco. Delta-6-desaturase Links Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism With Phospholipid Remodeling and Disease Progression in Heart Failure. **Circ Heart Fail.** 7 (1):172-183, 2014.

Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. **J. Biol. Chem.** 275 (33): 25130–25138, 2000.

Chatfield KC, Sparagna GC, Sucharov CC, Miyamoto SD, Grudis JE, Sobus RD, Hijmans J, Stauffer BL. Dysregulation of cardiolipin biosynthesis in pediatric heart failure. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 74:251–259 2014.

Chatterjee K. Neurohormonal activation in congestive heart failure and the role of vasopressin. **American Journal of Cardiololgy.** 95(9A): 8B-13B, 2005.

Chemin S.M.S.S.; Mura J. D. P. **Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia.** 2^aed. São Paulo: Roca. 2010.

Chen, Y., Liu, Y. & Dorn, G. W. Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis. **Circ. Res.** 109 (12):1327–1331, 2011.

Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. **J Biol Chem.** 278 (38):36027–36031, 2003.

Chernyak BV, Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites. **Eur J Biochem.** 15;238(3):623-30, 1996.

Chicco AJ, Sparagna GC. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. **Am J Physiol Cell Physiol.** 292(1):C33-44, 2007.

Chien KR. Sen A, Buja LM, Willerson JT Membrane phospholipid metabolism during myocardial ischaemia: past, present and future. **Basic Res Cardiol.** 82 Suppl 1:121-5. Review, 1987.

Chilton FH, Rudel LL, Parks JS, Arm JP, Seeds MC. Mechanisms by which botanical lipids affect inflammatory disorders. **Am. J. Clin. Nutr.** 87 (2):498S–503S, 2008.

Chor D, da Fonseca MJ, de Andrade CR. Cardiovascular diseases. Comments on early mortality in Brazil. **Arq Bras Cardiol.** 64(1):15-19, 1995.

Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, Logan A, Nadtochiy SM, Ord ENJ, Smith AC, Eyassu F, Shirley R, Hu CH, Dare AJ, James AM, Rogatti S, Hartley RC, Eaton S, Costa ASH, Brookes PS, Davidson SM, Duchon MR, Saeb-Parsy K, Shattock MJ, Robinson AJ, Work LM, Frezza C, Krieg T², Murphy MP. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. **Nature** 515 (7527):431–435, 2014.

Claypool SM, Koehler CM. The complexity of cardiolipin in health and disease. **Trends Biochem Sci.** 37 (1):32–41, 2012.

Colucci WS. The effects of norepinephrine on myocardial biology: implications for the therapy of heart failure. **Clinical Cardiology.** 21(12) Suppl 1: I20-24, 1998.

Costantini P, Chernyak BV, Petronilli V, Bernardi P. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. **J Biol Chem.** 271(12):6746-51, 1996.

Czernichow S, Thomas D, Bruckert E. n-6 Fatty acids and cardiovascular health: a review of the evidence for dietary intake recommendations. **Br J Nutr** 104 (6):788–796, 2010.

Dabkowski ER, Williamson CL, Bukowski VC, Chapman RS, Leonard SS, Peer CJ, Callery PS, Hollander JM. Diabetic cardiomyopathy-associated dysfunction in spatially distinct mitochondrial subpopulations. **American journal of physiology Heart and circulatory physiology.** 296(2):H359-369, 2009.

Davidoff AW, Boyden PA, Schwartz K, Michel JB, Zhang YM, Obayashi M, Crabbe D, Ter Keurs HEDJ. Congestive heart failure after myocardial infarction in the rat: cardiac force and spontaneous sarcomere activity. **Ann NY Acad Sci** 1015:84–95, 2004.

de Deckere EA, ten Hoor F. Effects of dietary fats on the coronary flow rate and the left ventricular function of the isolated rat heart. **Nutr. Metab.** 23(2):88–97, 1979.

De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabo I, Rizzuto R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. **Nature**. 476:336-340, 2011.

DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS - DATASUS. Informações de Saúde, Epidemiológicas e Morbidade: banco de dados. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>> Acesso em: 10 Ago. 2017.

Doenst T, Pytel G, Schrepper A, Amorim P, Färber G, Shingu Y, Mohr FW, Schwarzer M.. Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload. **Cardiovascular Research**. 86(3):461-470, 2010.

Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicology Pathology**. 35(4):495-516, 2007.

Fang J, Alderman MH, Keenan NL, Ayala C. Acute myocardial infarction hospitalization in the United States, 1979 to 2005. **Am J Med**. 123(3):259-266, 2010.

Faria T de O, Baldo MP, Simoes MR, Pereira RB, Mill JG, Vassallo DV, Stefanon I. Body weight loss after myocardial infarction in rats as a marker of early heart failure development. **Arch Med Res**. 42(4):274-80, 2011.

Farvid MS, Ding M, Pan A, Sun Q, Chiuve SE, Steffen LM, Willett WC, Hu FB. Dietary Linoleic Acid and Risk of Coronary Heart Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. **Circulation**. 130(18):1568-1578, 2014.

Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. **Curr Opin Plant Biol**. 7(3):254-61, 2004.

Ferrucci L, Cherubini A, Bandinelli S, Bartali B, Corsi A, Lauretani F, Martin A, Andres-Lacueva C, Senin U, Guralnik JM. Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. **J Clin Endocrinol Metab.**91(2):439–446, 2006.

Figueiroa MS, Peters JI. Congestive heart failure: Diagnosis, pathophysiology, therapy, and implications for respiratory care. **Respiratory Care.** 51(4):403-412, 2006.

Frank KF, Bolck B, Erdmann E, Schwinger RHG. Sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. **Cardiovascular Res.** 57(1):20-27, 2003.

Francis J, Weiss RM, Wei SG, Johnson AK, Felder RB. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. **Am J Physiol Reg Int CompPhysiol.** 281:R1734–R1745, 2001.

Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B, Scorrano L. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. **Cell** 126(1): 177–189, 2006.

Friguet B, Bulteau AL, Petropoulos I. Mitochondrial protein quality control: implications in ageing. **Biotechnology Journal.** 3(6): 757-764, 2008.

Galvao TF, Brown BH, Hecker PA, O'Connell KA, O'Shea KM, Sabbah HN, Rastogi S, Daneault C, Des Rosiers C, Stanley WC. High intake of saturated fat, but not polyunsaturated fat, improves survival in heart failure despite persistent mitochondrial defects. **Cardiovascular Research** 93(1):24–32, 2012.

Gauí EN, Klein CH, Oliveira GMM. Mortality due to heart failure: extended analysis and temporal trend in three states of Brazil. **Arq Bras Cardiol.** 94(1):52-58, 2010

Gilkerson RW, Selker JM, Capaldi RA. The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. **FEBS letters.** 546(2-3):355-8, 2003.

Giorgio V, von Stockum S, Antoniel M, Fabbro A, Fogolari F, Forte M, Glick GD, Petronilli V, Zoratti M, Szabó I, Lippe G, Bernardi P. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. **Proc. Natl Acad. Sci. USA.** 110(5): 5887–5892, 2013.

Goikoetxea MJ, Beaumont J, González A, López B, Querejeta R, Larman M, Díez J. Altered cardiac expression of peroxisome proliferator-activated receptor-isoforms in patients with hypertensive heart disease. **Cardiovasc. Res.** 69(4): 899–907, 2006.

Gomez-Soto FM, Andrey JL, Garcia-Egido AA, Escobar MA, Romero SP, Garcia-Arjona R, Gutierrez J, Gomez F. Incidence and mortality of heart failure: A community-based study. **Int J Cardiol.** 151(1):40-5, 2011.

Gorski PA, Ceholski DK, Hajjar RJ. Altered myocardial calcium cycling and energetics in heart failure — a rational approach for disease treatment. **Cell. Metab.** 21(2):183–194, 2015.

Grevenko TJ, Martin SA, Katunga L, Cooper DE, Anderson EJ, Murphy RC, Coleman RA. Acyl-CoA synthetase 1 deficiency alters cardiolipin species and impairs mitochondrial function. **Journal of Lipid Research.** 56(8):1572-82, 2015.

Gutiérrez T, Parra V, Troncoso R, Pennamen C, Contreras-Ferrat A, Vasquez-Trincado C, Morales PE, Lopez-Crisosto C, Sotomayor-Flores C, Chiong M, Beverly A, Rothermel BA, Lavandero S. Alteration in mitochondrial Ca^{2+} uptake disrupts insulin signaling in hypertrophic cardiomyocytes. **Cell Commun. Signal.** 12:68, 2014.

Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. **Exp. Physiol.** 91(5):807–819, 2006.

Gwathmey JK, Copelas L, MacKinnon R, Schoen FJ, Feldman MD, Grossman W, Morgan JP. Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. **Circ Res.** 61(1):70-76, 1987.

Haigney MC, Lakatta EG, Stern MD, Silverman HS. Sodium channel blockade reduces hypoxic sodium loading and sodium-dependent calcium loading. **Circulation** 90(1): 391–399, 1994.

Hales KG, Fuller MT. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. **Cell.** 90(1):121-129, 1997.

Hardman WE. (n-3) Fatty acids and cancer therapy. **J. Nutr.** 134(12 suppl): 3427S-3430S, 2004.

Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R et al. Relation between 21 myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase in failing and nonfailing human myocardium. **Circ Res.** 75(3):434–42, 1994.

Hayward C, Banner NR, Morley-Smith A, Lyon AR, Harding SE. The Current and Future Landscape of SERCA Gene Therapy for Heart Failure:A Clinical Perspective. **Human Gene Therapy** 26(5):293–304, 2015.

Heather LC, Carr CA, Stuckey DJ, Pope S, Morten KJ, Carter EE, Edwards LM, Clarke K. Critical role of complex III in the early metabolic changes following myocardial infarction. **Cardiovasc Res.** 85(1):127-36, 2010.

Heather LC, Cole MA, Tan JJ, Ambrose LJ, Pope S, Abd-Jamil AH, Carter EE, Dodd MS, Yeoh KK, Schofield CJ, Clarke K. Metabolic adaptation to chronic hypoxia in cardiac mitochondria. **Basic Res Cardiol.** 107(3):268, 2012.

Hernansanz-Agustín P, Ramos E, Navarro E, Parada E, Sánchez-López N, Peláez-Aguado L, Cabrera-García JD, Tello D, Buendia I, Marina A, Egea J, López MG, Bogdanova A, Martínez-Ruiz A. Mitochondrial complex I deactivation is related to superoxide production in acute hypoxia. **Redox Biology** 12:1040-1051, 2017.

Hoffman NE, Chandramoorthy HC, Shanmughapriya S, Zhang XQ, Vallem S, Doonan PJ, Malliankaraman K, Guo S, Rajan S, Elrod JW, Koch WJ, Cheung JY, Madesh M. SLC25A23 augments mitochondrial Ca^{2+} uptake, interacts with MCU, and induces oxidative stress mediated cell death. **Mol Biol Cell** 25(6):936-947, 2014.

Hoffmann P, Mest HJ, Krause EG, Will-Shahab L. Investigations on the mechanism of a diminished inotropic isoprenaline effect in isolated rat hearts after high linoleic acid diet. **Biomed. Biochim. Acta** 47(9):881–886, 1998.

Hollander JM, Thapa D, Shepherd DL. Physiological and structural differences in spatially distinct subpopulations of cardiac mitochondria: influence of cardiac pathologies. **American journal of physiology Heart and circulatory physiology.**307(1):H1-14, 2014.

Hoppel CL, Tandler B, Parland W, Turkaly JS, Albers Hamster cardiomyopathy LD. A defect in oxidative phosphorylation in the cardiac interfibrillar mitochondria. **J Biol Chem** 257(3):1540–1548, 1982.

Houser SR., Piacentino III V, Weisser J. Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart. **J Mol Cell Cardiol.** 32:1595-1607, 2000.
Houtkooper RH, Vaz FM. Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. **Cell Mol Life Sci.** 65(16):2493-2506, 2008.

Ingwall JS, Kramer MF, Fifer MA, Lorell BH, Shemin R, Grossman W, Allen PD. The creatine kinase system in normal and diseased human myocardium. **N Engl J Med.** 313(17):1050–1054, 1985.

Jeng JY, Yeh TS, Chiu YH, Lee YC, Cheng HH, Hsieh RH. Linoleic acid promotes mitochondrial biogenesis and maintains mitochondrial structure for prevention of streptozotocin damage in RIN-m5F cells. **Biosci Biotechnol Biochem.** 73(6):1262-7, 2009.

Jeong SY, Seol DW. The role of mitochondria in apoptosis. **BMB reports.** 41(1):11-22, 2008.

John W. Elrod, Renee Wong, Shikha Mishra, Ronald J. Vagnozzi, Bhuvana Sakthivel, Sanjeewa A. Goonasekera, Jason Karch, Scott Gabel, John Farber, Thomas Force, Joan Heller Brown, Elizabeth Murphy, and Jeffery D. Molkentin. Cyclophilin D controls mitochondrial pore–dependent Ca²⁺ exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice. **The Journal of Clinical Investigation.** 120(10): 3689-3687, 2010.

Kadenbach B, Ramzan R, Moosdorf R, Vogt S. The role of mitochondrial membrane potential in ischemic heart failure. **Mitochondrion.** 11(5):700–706, 2011.

Kang JX, Leaf A. Effects of long-chain polyunsaturated fatty acids on the contraction of neonatal rat cardiac myocytes. **Proc Natl Acad Sci USA**. 11;91(21):9886-90, 1994.

Kerr JF, Wyllie AW, Currier AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**. 26(4):239-257, 1972.

Kohlhaas M, Liu T, Knopp A, Zeller T, Ong MF, Bohm M, O'Rourke B, Maack C. Elevated cytosolic Na⁺ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes. **Circulation** 121(14):1606-1613, 2010.

Koretsune Y, Corretti MC, Kusuoka H, Marban E. Mechanism of early ischemic contractile failure. Inexcitability, metabolite accumulation, or vascular collapse? **Circ Res**. 68(1):255-62, 1991.

Korge P, Yang L, Yang JH, Wang Y, Qu Z, Weiss JN. Protective role of transient pore openings in calcium handling by cardiac mitochondria. **The Journal of biological chemistry**. 286(40):34851-34857, 2011.

Kowaltowski, AJ. Participação da mitocôndria na regulação da viabilidade celular. Título de livre docência da Universidade de São Paulo, 2004.

Kwong JQ. The mitochondrial calcium uniporter in the heart- energetics and beyond. **The journal of physiology**. 595 (12): 3743-3751, 2017.

Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. **Pflügers Archiv**. 61: 291-332, 1989.

Lapiente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, Latorre-Pellicer A, Colás C, Balsa E, Perales-Clemente E, Quirós PM, Calvo E, Rodríguez-Hernández MA, Navas P, Cruz R, Carracedo Á, López-Otín C, Pérez-Martos

A, Fernández-Silva P, Fernández-Vizarra E, Enríquez JA. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. **Science** 340 (6140), 1567–1570, 2013.

Lederer WJ, Bers DM, Eisner DA. Calcium signaling in heart: multiscale, diverse, rapid, local, and remarkable. **J Mol Cell Cardiol.** 58: 3-4, 2013.

Lee GJ, Kim SK, Kang SW, Kim OK, Chae SJ, Choi S, Shin JH, Park HK, Chung JH. Real time measurement of myocardial oxygen dynamics during cardiac ischemia reperfusion of rats. **Analyst.** 137(22):5312-5319, 2012.

Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. **J. Clin. Invest.** 106(7):847–856, 2000.

Lesnefsky EJ, Chen Q, Slabe TJ, Stoll MS, Minkler PE, Hassan MO, Tandler B, Hoppel CL. Ischemia, rather than reperfusion, inhibits respiration through cytochrome oxidase in the isolated, perfused rabbit heart: role of cardiolipin. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 287(1):H258-67, 2004.

Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial Dysfunction in Cardiac Disease: Ischemia–Reperfusion, Aging, and Heart Failure. **J Mol Cell Cardiol.** 33(6): 1065–1089, 2001.

Levitan EB, Wolk A, Hakansson N., Mittleman MA. α -Linolenic acid, linoleic acid and heart failure in women. **British Journal of Nutrition.** 108(7):1300–1306, 2012.

Liesa, M.; Palacin, M.; Zorzano, A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. **Physiological Reviews.** 89(3):799-845, 2009.

Lim SY, Hausenloy DJ, Arjun S, Price AN, Davidson SM, Lythgoe MF, Yellon DM. Mitochondrial cyclophilin-D as a potential therapeutic target for post-myocardial infarction heart failure. **J. Cell. Mol. Med.** 15(11):2443-2451, 2011.

Lisboa Junior, Sergio. Avaliação do desempenho cardíaco de ratos infartados e tratados com óleo de soja por via intramuscular. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo. 2012.

Liu X, Hajnoczky G. Ca²⁺-dependent regulation of mitochondrial dynamics by the Miro-Milton complex. **The international journal of biochemistry & cell biology.** 41(10):1972-6, 2009.

Llimoa F. Co-ativador de transcrição gênica PGC-1 na pancreatite aguda. Tese (doutorado)- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2011.

Lopez-Crisosto C, Pennanen C, Vasquez-Trincado C, Morales PE, Bravo-Sagua R, Quest AFG et al (2017) Sarcoplasmic reticulum-mitochondria communication in cardiovascular pathophysiology. **Nat Rev Cardiol** 14(6):342–360

Lu X, Ginsburg KS, Kettlewell S, Bossuyt J, Smith GL, Bers DM. Measuring local gradients of intramitochondrial [Ca²⁺] in cardiac myocytes during sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release. **Circ. Res.** 112(3):424–431, 2013.

Lu X, Kwong JQ, Molkentin JD, Bers DM. Individual Cardiac Mitochondria Undergo Rare Transient Permeability Transition Pore Openings. **Circulation research.** 118(5):834-41, 2016.

Lukyanenko V, Chikando A, Lederer WJ. Mitochondria in cardiomyocyte Ca²⁺ signaling. **The international journal of biochemistry & cell biology.** 41(10):1957-1971, 2009.

Luz FE, Santos BRM, Sabino W. Estudo comparativo de mortalidade por doenças cardiovasculares em São Caetano do Sul (SP), Brasil, no período de 1980 a 2010. **Ciência & Saúde Coletiva**. 22(1):161-168, 2017.

Maack C, Cortassa S, Aon MA, Ganesan AN, Liu T, O'Rourke B. Elevated cytosolic Na⁺ decreases mitochondrial Ca²⁺ uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes. **Circ. Res.** 99(2):172–182, 2006.

Mahan LK, Escott-Stump SK. Alimentos, nutrição e dietoterapia. 10^a ed. São Paulo: Roca, 2005.

Mallilankaraman K, Doonan P, Cardenas C, Chandramoorthy HC, Muller M, Miller R, Hoffman NE, Gandhirajan RK, Molgo J, Birnbaum MJ, Rothberg BS, Mak DO, Foskett JK, Madesh M. MICU1 is an essential gatekeeper for MCU-mediated mitochondrial Ca(2+) uptake that regulates cell survival. **Cell**. 151(3): 630-644, 2012.

Mansur AP, Favarato D. Mortality due to cardiovascular diseases in Brazil and in the metropolitan region of São Paulo: a 2011 update. **Arq Bras Cardiol**. 99(2):755-61, 2012.

Mansur AP, Favarato D. Trends in Mortality Rate from Cardiovascular Disease in Brazil, 1980-2012. **Arq Bras Cardiol**. [online].ahead print, PP.0-0, 2016.

Maranzana E, Barbero G, Falasca AI, Lenaz G & Genova ML. Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. **Antioxid. Redox Signal**. 19(13): 1469–1480, 2013.

McCusker MM, Grant-Rant-Kels JM. Healing fats of the skin: the structural and immunologic roles of the ω -6 and ω -3 fatty acids. **Clinics in Dermatology**. 28(4):440–451, 2010.

Meeusen S, DeVay R, Block J, Cassidy-Stone A, Wayson S, McCaffery JM, Nunnari J. Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin related GTPase Mgm1. **Cell** 127(2): 383–395, 2006.

Mill JG, Novaes MA, Galon M, Nogueira JB, Vassallo DV. Comparison of the contractile performance of the hypertrophied myocardium from spontaneous hypertensive rats and normotensive infarcted rats. **Can J Physiol Pharmacol.** 76(4): 387-39, 1998.

Mill JG, Stefanon I, Leite CM, Vassallo DV. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. **Cardiovasc Res.** 24(9): 748-753, 1990.

Mill JG, Stefanon I, dos Santos L, Baldo MP. Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progression for heart failure. **Braz J Med Biol Res.** 44(9):890-898, 2011.

Mitchell LA, Grant DF, Melchert BR, Petty NM, Kennedy RH. Linoleic Acid Metabolites Act to Increase Contractility in Isolated Rat Heart. **Cardiovascular Toxicology** 2(3):219–229, 2002.

Mitchell, L.A., Moran, J.H., and Grant, D.F. (2002). Linoleic acid, cis-epoxyoctadecenoic acids, and dihydroxyoctadecadienoic acids are toxic to Sf-21 cells in the absence of albumin. *Toxicol. Lett.* 126(3):187–196.

Mitchell P, Moyle J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. **Nature.** 213(5072):137-9, 1967.

Miwa S, Brand MD. Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling. **Biochemical Society Transactions** 31(6):1300-1301, 2003.

Monteiro P, Oliveira PJ, Providência LA. Mitocôndrias: Que Papel na Isquemia, Reperusão e Morte Celular? **Rev Port Cardiol.** 22(2):233-254, 2003.

Movahed MR, John J, Hashemzadeh M, Jamal MM, Hashemzadeh M. Trends in the age adjusted mortality from acute ST segment elevation myocardial infarction in the United States (1988-2004) based on race, gender, infarct location and comorbidities. **Am J Cardio.** 104(8):1030-1034, 2009.

Mulligan CM, Sparagna GC, Le CH, De Mooy AB, Routh MA, Holmes MG, Hickson-Bick DL, Zarini S, Murphy RC, Xu FY, Hatch GM, McCune SA, Moore RL, Chicco AJ. Dietary linoleate preserves cardiolipin and attenuates mitochondrial dysfunction in the failing rat heart. **Cardiovascular Research.** 94(3): 460–468, 2012.

Murgia M, Giorgi C, Pinton P, Rizzuto R. Controlling metabolism and cell death: at the heart of mitochondrial calcium signalling. **Journal of molecular and cellular cardiology.** 46(6):781-8, 2009.

Murphy E, Eisner DA, Regulation of intracellular and mitochondrial sodium in health and disease. **Circ. Res.** 104:292–303, 2009.

Nasa Y, Sakamoto Y, Sanbe A, Sasaki H, Yamaguchi F, Takeo S. Changes in fatty acid compositions of myocardial lipids in rats with heart failure following myocardial infarction. **Mol Cell Biochem.** 176(1-2):179-89, 1997.

Neubauer S, Horn M, Cramer M, Harre K, Newell JB, Peters W, Pabst T, Ertl G, Hahn D, Ingwall JS, Kochsiek K. Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. **Circulation.** 96:2190–2196, 1997.

Neubauer S. The failing heart--an engine out of fuel. **N Engl J Med.** 356(11):1140–1151, 2007.

Nicholls DG, Ferguson SJ. *Bioenergetics* 4^a ed (Academic, 2013).

Nicholls DG. Mitochondria and calcium signaling. **Cell calcium.** 38(3-4):311-317, 2005.

Nojiri H, Shimizu T, Funakoshi M, Yamaguchi O, Zhou H, Kawakami S, Ohta Y, Sami M, Tachibana T, Ishikawa H, Kurosawa H, Kahn RC, Otsu K, Shirasawa T. Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. **Journal of Biological Chemistry.** 281(44):33789-33801, 2006.

Okumura K, Nishiura T, Shimizu K, Iwama Y, Kondo J, Hashimoto H, Ito T. Fatty acid composition in 1,2-diacylglycerol of diabetic and insulin-treated diabetic rat hearts. **Jpn Heart J.** 32(5):667-73, 1991.

Oliveira Junior SA, Padovani CR, Rodrigues SA, Silva NR, Martinez PF, Campos DH, Okoshi MP, Okoshi K, Dal-Pai M, Cicogna AC. Extensive impact of saturated fatty acids on metabolic and cardiovascular profile in rats with diet-induced obesity: a canonical analysis. **Cardiovascular Diabetology.** 15;12:65, 2013.

Ong SB. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. **Circulation.** 121(18):2012-2022, 2010.

Orchard C, Brette F. T-tubules and sarcoplasmic reticulum function in cardiac ventricular myocytes. **Cardiovasc Res.** 77(2): 237-244, 2008.

Orr AL, Ashok D, Sarantos MR, Shi T, Hughes RE, Brand MD. Inhibitors of ROS production by the ubiquinone-binding site of mitochondrial complex I identified by chemical screening. **Free Radic. Biol. Med.** 65: 1047–1059, 2013.

Oxenoid K, Dong Y, Cao C, Cui T, Sancak Y, Markhard AL, Grabarek Z, Kong L, Liu Z, Ouyang B, Cong Y, Mootha VK, Chou JJ. Architecture of the mitochondrial calcium uniporter. **Nature**. 533(7602):269-273, 2016.

Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. **The Journal of biological chemistry**.252(23):8731-8739, 1977.

Palojoki E, Saraste A, Eriksson A, Pulkki K, Kallajoki M, Voipio-Pulkki LM, Tikkanen I. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 280(6): 2726-2731, 2001.

Papanicolaou KN, Kikuchi R, Ngoh GA, Coughlan KA, Dominguez I, Stanley WC, Walsh K. Mitofusins 1 and 2 are essential for postnatal metabolic remodeling in heart. **Circ. Res.** 111 (8), 1012–1026, 2012.

Parsons MJ, Green DR. Mitochondria in cell death. **Essays Biochem.** 47:99–114. 2010.

Passos VMDA; Assis, TD; Barreto, SM. Hipertensão arterial no Brasil: estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional. **Epidemiologia e serviços de Saúde**. 15(1):35-45, 2006

Patergnani S, Suski JM, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Giorgi C, Marchi S, Missiroli S, Poletti F, Rimessi A, Duszyński

J, Wieckowski MR, Pinton P. Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). **Cell Commun Signal**. 9:19, 2011.

Patron M, Checchetto V, Raffaello A, Teardo E, Vecellio Reane D, Mantoan M, Granatiero V, Szabo I, De Stefani D, Rizzuto R. MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca^{2+} uniporter by exerting opposite effects on MCU activity. **Mol Cell** 53(5):726-737, 2014.

Pereira RB, Sartorio CL, Vassallo DV, Stefanon I. Differences in tail vascular bed reactivity in rats with and without heart failure following myocardial infarction. **J Pharmacol Exp Ther**. 312(3):1321-5, 2004.

Pereverzev MO, Vygodina TV, Konstantibov AA, Skulachev VP. Cytochrome c, an ideal antioxidant. **Biochem Soc Trans**. 31:1312-1315, 2003.

Perocchi F, Gohil VM, Girgis HS, Bao XR, McCombs JE, Palmer AE, Mootha VK. MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca^{2+} uptake. **Nature** 467(7313):291-296, 2010.

Petrosillo G, Ruggiero FM, Di Venosa N, Paradies G. Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin. **FASEB J**. 17(6):714–716, 2003.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. **Circ Res**. 44(4):503-12, 1979.

Pfeiffer K, Gohil V, Stuart RA, Hunte C, Brandt U, Greenberg ML, Schägger H. Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. **J. Biol. Chem**. 278(52):52873–52880, 2003.

Pietri S, Bernard M, Cozzone PJ. Hydrodynamic and energetic aspects of exogenous free fatty acid perfusion in the isolated rat heart during high flow anoxia and reoxygenation: a ^{31}P magnetic resonance study. **Cardiovasc Res.** 25(5):398-406, 1991.

Plovanich M, Bogorad RL, Sancak Y, Kamer KJ, Strittmatter L, Li AA, Girgis HS, Kuchimanchi S, De Groot J, Speciner L, Taneja N, Oshea J, Koteliensky V, Mootha VK. MICU2, a paralog of MICU1, resides within the mitochondrial uniporter complex to regulate calcium handling. **PLoS One.** 8(2):e55785, 2013.

Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY, Krauss S, Mootha VK, Lowell BB, Spiegelman BM. Cytokine Stimulation of Energy Expenditure through p38 MAP Kinase Activation of PPAR Coactivator-1. **Molecular Cell.** 8(5): 971–982, 2001.

Q. He, X. Han. Cardiolipin remodeling in diabetic heart. **Chemistry and Physics of Lipids** 179:75–81. 2014.

Raffaello A, De Stefani D, Sabbadin D, Teardo E, Merli G, Picard A, Checchetto V, Moro S, Szabo I, Rizzuto R. The mitochondrial calcium uniporter is a multimer that can include a dominant-negative pore-forming subunit. **EMBO J.** 32(17): 2362-2376, 2013.

Ratnayake WMN, Galli C. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. **Ann. Nutr. Metab.** 55(1-3):08–43, 2009.

Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. **Cardiovasc. Res.** 86(2):236–242, 2010.

Ribeiro Junior RF, Fernandes AA, Meira EF, Batista PR, Siman FD, Vassallo DV, Padilha AS, Stefanon I. Soybean oil increases SERCA2a expression and left ventricular contractility in rats without change in arterial blood pressure. **Lipids Health Dis.** 26;9:53, 2010.

Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA, Pozzan T Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses. **Science** 280(5370): 1763–1766, 1998.

Roger VL, Weston SA, Redfield MM, Hellermann-Homan JP, Killian J, Yawn BP, Jacobsen SJ. Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. **JAMA.** 292(3):344-350, 2004.

Rolim NP, Medeiros A, Rosa KT, Mattos KC, Irigoyen MC, Krieger EM, Krieger JE, Negrão CE, Brum PC. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca^{2+} handling protein expression in heart failure. **Physiological Genomics.** 29(3):246-252, 2007.

Rosca MG, Hoppel CL. New aspects of impaired mitochondrial function in heart failure. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes.** 41(2):107-112, 2009.

Rosca MG, Vazquez EJ, Kerner J, Parland W, Chandler MP, Stanley W, Sabbah HN, Hoppel CL. Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. **Cardiovascular Research.** 80(1):30-39, 2008.

Rossi CS, Lehninger AL. Stoichiometry of Respiratory Stimulation, Accumulation of Ca^{++} and Phosphate, and Oxidative Phosphorylation in Rat Liver Mitochondria. **Journal of Biological Chemistry.** 239:3971-3980, 1964.

Rowe GC, Jiang A, Arany Z. PGC-1 Coactivators in Cardiac Development and Disease. **Circ Res.**107(7):825-838, 2010.

Rubinstein A, Colantoniol L, Bardachl A, Caporalel J, Martil SG, Kopitowskill K, Alcarazl A, Gibbons L, Augustovskil F, Pichon-Rivierel A. Estimacion de la carga de las enfermedades cardiovasculares atribuible a factores de riesgo modificables en Argentina. **Rev Panam Salud Publica.** 27(4):237-245, 2010.

Ryu SY, Beutner G, Kinnally KW, Dirksen RT, Sheu SS. Single channel characterization of the mitochondrial ryanodine receptor in heart mitoplasts. **The Journal of biological chemistry.** 286(24):21324-9, 2011.

Sack MN, Rader TA, Park S, Bastin J, McCune SA, Kelly DP. Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. **Circulation** 94(11):2837–2842, 1996.

Sancak Y, Markhard AL, Kitami T, Kovacs-Bogdan E, Kamer KJ, Udeshi ND, Carr SA, Chaudhuri D, Clapham DE, Li AA, Calvo SE, Goldberger O, Mootha VK. EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex. **Science** 342(6164): 1379-1382, 2013.

Santulli G, Xie W, Reiken SR, Marks AR. Mitochondrial calcium overload is a key determinant in heart failure. **PNAS.** 112(36):11389-11394, 2015.

Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. **Journal of applied physiology.** 79(3):675-86, 1995.

Sharma VK, Ramesh V, Franzini-Armstrong C & Sheu SSS. Transport of Ca²⁺ from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in rat ventricular myocytes. **J. Bioenerg. Biomembr.** 32(1):97–104, 2000.

Sharov VG, Goussev A, Lesch M, Goldstein S, Sabbah HN. Abnormal mitochondrial function in myocardium of dogs with chronic heart failure. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. 30(9):1757-1762, 1998.

Sihag S, Cresci S, Li AY, Sucharov CC, Lehman JJ. *PGC-1 α* and *ERR α* target gene downregulation is a signature of the failing human heart. **J. Mol. Cell. Cardiol**. 46(2): 201–212, 2009.

Sikkel MB, Hayward C, MacLeod KT, Harding SE, Lyon AR. SERCA2a gene therapy in heart failure: an anti-arrhythmic positive inotrope. **Br J Pharmacol** 171(1):38-54, 2014.

Silva VR; Cade NV; Molina MDCB. Risco coronariano e fatores associados em hipertensos de uma unidade de saúde da família [Coronary risk and associated factors in hypertensive patients at a family health clinic]. **Revista Enfermagem UERJ**. 20(4):439-444, 2013.

Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 60(9):502–507, 2006.

Simopoulos AP. Omega-3 Fatty Acids and Cancer. **Indoor Built Environ**. 16(2):405–412,2003.

Siqueira ASE, Siqueira-filho AG, Land MGP. Análise do Impacto econômico das Doenças Cardiovasculares nos Últimos Cinco Anos no Brasil. **Arq Bras Cardiol**. 109(1):39-46, 2017.

Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szelag A, Schulz R. Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium. **Journal of Pharmacology and Toxicology Methods**. 55(2): 113-126, 2007.

Skulachev VP. Membrane-linked systems preventing superoxide formation. **Biosci Rep.** 17(3): 47-366, 1997.

Skulachev VP. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. **Biochimica et biophysica acta.** 1363(2):100-24, 1998.

Sparagna GC, Lesnefsky EJ Cardiolipin remodeling in the heart. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 53(4):290–301, 2009.

Spadaro J, Hashimoto LM, Franco RSS, Bregagnol EA, Tucci PJF, Efeito da administração prévia de amiodarona na incidência precoce de fibrilação ventricular durante isquemia miocárdica experimental. **Arq. Bras. Cardiol.** 42(1): 25-29, 1984.

Stanley WC, Chandler MP. Energy metabolism in the normal and failing heart: potential for therapeutic interventions. **Heart Fail Rev.** 7(2):115–130, 2002.

Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. **Physiol Rev** 85(3):1093–1129, 2005.

Stefanon I, Cade JR, Fernandes AA, Ribeiro Junior RF, Targueta GP, Mill JG, Vassallo DV. Ventricular performance and Na⁺-K⁺ ATPase activity are reduced early and late after myocardial infarction in rats. **Braz J Med Biol Res.** 42(10):902-11, 2009.

Stefanon I, Valero-Munoz M, Fernandes AA, Ribeiro RF Jr, Rodriguez C, Miana M, Martinez-Gonzalez J, Spalenza JS, Lahera V, Vassallo PF, Cachofeiro V. Left and right ventricle late remodeling following myocardial infarction in rats. **PLoS One** 8(5):e64986, 2013.

Stefanon I, Vassallo DV, Mill JG. Left ventricular length dependent activation in the isovolumetric rat heart. **Cardiovascular Research**. 24(3): 254-256, 1990.

Stefanon I. Desempenho contrátil e reatividade vascular do coração isolado de rato apos infarto agudo do miocárdio. Tese de doutorado em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do espirito Santo. Vitória, 1998.

St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB, Spiegelman BM. Bioenergetic Analysis of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Coactivators α and 1β (PGC-1 α and PGC-1 β) in Muscle Cells. **J. Biol. Chem**. 278(29):26597-26603, 2003.

Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. **Circulation**. 101(25): 2981-2988, 2000.

Szabadkai G, Simoni AM, Bianchi K, De Stefani D, Leo S, Wieckowski MR, Rizzuto R. Mitochondrial dynamics and Ca^{2+} signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1763(5-6):442-449, 2006.

Takahashi E, Sato K, Endoh H, Xu ZL, Doi K. Direct observation of radial intracellular PO₂ gradients in a single cardiomyocyte of the rat. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 275: H225–H233, 1998.

Tahara, EB, Navarete, FD, Kowaltowski, AJ. Tissue-, substrate-, and site specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. **Free Radical Biology and Medicine**. 46(9): 1283-1297, 2009.

ten Hoor F. Cardiovascular effects of dietary linoleic acid. **Nutr. Metab**. 24(Suppl. 1):162–180, 1980.

Territo PR, Mootha VK, French SA, Balaban RS. $\text{Ca}^{(2+)}$ activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F(0)/F(1)-ATPase. **American journal of physiology Cell physiology**. 278(2):C423-35, 2002.

Tomar D, Dong Z, Shanmughapriya S, Koch DA, Thomas T, Hoffman NE, Timbalia SA, Goldman SJ, Breves SL, Corbally DP, Nemani N, Fairweather JP, Cutri AR, Zhang X, Song J, Jana F, Huang J, Barrero C, Rabinowitz JE, Luongo TS, Schumacher SM, Rockman ME, Dietrich A, Merali S, Caplan J, Stathopoulos P, Ahima RS, Cheung JY, Houser SR, Koch WJ, Patel V, Gohil VM, Elrod JW, Rajan S, Madesh M. MCUR1 Is a Scaffold Factor for the MCU Complex Function and Promotes Mitochondrial Bioenergetics. **Cell Rep** 15(8):1673-1685, 2016.

Tucci PJF. Características Fisiopatológicas do Modelo de Insuficiência Cardíaca Pós-infarto do Miocárdio no Rato. **Arq Bras Cardiol**. 96(5):420-424, 2011.

Vais H, Mallilankaraman K, Mak DO, Hoff H, Payne R, Tanis JE, Foskett JK. EMRE Is a Matrix $\text{Ca}^{(2+)}$ Sensor that Governs Gatekeeping of the Mitochondrial $\text{Ca}^{(2+)}$ Uniporter. **Cell Rep** 14(3): 403-410, 2016.

Vance JE. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. **J. Biol. Chem**. 265(13):7248–7256, 1990.

Vassallo DV, Lima EQ, Campagnaro P, Stefanon I, Leite CM, Mill JG. Effects of isoproterenol on the mechanical activity of isolated papillary muscles and perfused rat hearts in various calcium concentrations. **Pharmacological Research**. 29(3): 251-260, 1994.

Weinbrenner C, Liu GS, Downey JM, Cohen MV. Cyclosporine A limits myocardial infarct size even when administered after onset of ischemia. **Cardiovascular research**. 38(3):676-84, 1998.

Willett WC. The role of dietary n-6 fatty acids in the prevention of cardiovascular disease. **J Cardiovasc Med** 8(Suppl 1):S42–S45, 2007.

Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1. **Cell**. 98(1): 115–124, 1999.

Yamaoka-Koseki S, Urade R, Kito M. Cardiolipins from rats fed different dietary lipids affect bovine heart cytochrome c oxidase activity. **J Nut.**121(7): 956 –958, 1991.

YaqoobB, P. Fatty acids and the immune system: from basic science to clinical applications. **Proceedings of the Nutrition Society**, 63(1):89–104, 2004.

Zhao Y, Xu JX. The operation of the alternative electron-leak pathways mediated by cytochrome c in mitochondria. **Biochem Biophys Res Commun**. 317(4):980-987, 2004.

Ziello JE, Jovina IS, Huang Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Regulatory Pathway and its Potential for Therapeutic Intervention in Malignancy and Ischemia. **Yale Journal of Biology and Medicine** 80(2):51-60, 2007.

Zornoff LA, Paiva SAR, Minicucci MFi, Spadaro J. Infarto do miocárdio experimental em ratos: análise do modelo. **Arq Bras Cardiol**. 93(3):434-440, 2009.